

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

Untersuchung zur Prävalenz von Sindbisviren in Stechmücken aus Zentralschweden

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

eingereicht von
Johanna Maria Fürst
aus Gunzenhausen

Leipzig, 2020

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, Bernhard-Nocht-Institut für
Tropenmedizin, Hamburg

Tag der Verteidigung: 23. Juni 2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	II
1 Einleitung	1
2 Literatur	2
2.1 Alphaviren	2
2.1.1 Taxonomie der Alphaviren	2
2.1.2 Aufbau und Vermehrung der Alphaviren	2
2.2 Sindbisviren	6
2.2.1 Geschichte und Epidemiologie des Sindbisvirus	6
2.2.2 Übertragung von Sindbisviren	9
2.2.3 Sindbisviren als Krankheitserreger beim Menschen	12
2.3 Stechmücken	16
2.3.1 Taxonomie, Entwicklung und Anatomie der Stechmücken	16
2.3.2 Wirtsfindung und Stechakt	17
2.3.3 Stechmücken-Arten und Verbreitung in Schweden	18
3 Material und Methoden	20
3.1 Sammeln der Stechmücken	20
3.2 Homogenisieren der Stechmückenproben und RNA-Extraktion	20
3.3 Nachweis von Sindbisvirus mittels real-time RT-PCR	21
3.4 Viruskultivierung	23
3.5 Statistische Analyse	24
4 Ergebnisse	25
4.1 Sammeln der Stechmücken	25
4.2 SINV Detektion mittels real-time RT-PCR	25
4.3 Virusisolation	33
5 Diskussion	34
6 Zusammenfassung	41
7 Summary	43
8 Literaturverzeichnis	45
9 Danksagung	57

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
&	und
Abb.	Abbildung
Ae.	<i>Aedes</i>
AG	Aktiengesellschaft
bp	Basenpaare
ca.	circa
CCL	Chemokinligand
CI	Konfidenzintervall (Confidence Interval)
cm ²	Quadratcentimeter
Co.KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
CPE	Cytopathischer Effekt
Cs.	<i>Culiseta</i>
Ct	Schwellenwert-Zyklus (Cycle threshold)
Cx.	<i>Culex</i>
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay (antikörperbasiertes Nachweisverfahren)
et al.	und andere (et alii)
FKS	Fetales Kälber Serum
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut

g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IR	Infektionsrate (Infection Rate)
mg	Milligramm
MIR	Minimale Infektionsrate (Minimum Infection Rate)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B-Ligand
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Reverse Transkriptase
S	Svedberg Konstante
sek	Sekunden
SINV	Sindbisvirus/Sindbisviren
spp.	mehrere Spezies/Arten (species pluralis)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (United States of America)

v.a.	vor allem
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Sindbisviren gehören zur Familie der Togaviren und sind das Prototypvirus des Genus *Alphavirus* (Weaver et al. 2005). Während Vögel die Hauptwirte von SINV sind, stellen Stechmücken die Vektoren dar. Hierbei spielen insbesondere die ornithophilen *Culex pipiens/Cx. torrentium* und *Culiseta morsitans* eine große Rolle als enzootische Vektoren, während *Aedes cinereus* und *Aedes rossicus* die Rolle als Brückenvektoren innehaben (Francy et al. 1989, Lundström et al. 2013, Hesson et al. 2015). Nach der Übertragung von SINV auf den Menschen durch Stechmückenstiche kann es zu Fieber, Hautausschlag und Gelenkbeschwerden kommen (Skogh and Espmark 1982, Lundström 1999, Hesson et al. 2015). Obwohl SINV in großen Teilen Schwedens endemisch ist, kommt es nur alle sieben Jahre zu gehäuften Fällen der sogenannten Ockelbo-Krankheit beim Menschen (Turunen et al. 1998, Bergqvist et al 2015). Bisher gibt es keine Langzeituntersuchungen, die diese Hypothese ausreichend stützen, so konnte z.B. kein Zusammenhang zwischen der Prävalenz in Vögeln und den humanen Fallzahlen gefunden werden (Hesson et al. 2016). Alternativ zu den Vogelwirten, wurden Stechmücken aus Zentralschweden der Jahre 2001 - 2003 auf das Virus untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass die Prävalenz im Ausbruchsjahr 2002 deutlich höher lag als in den anderen untersuchten Jahren (Lundström et al. 2019). In der hier vorliegenden Studie wurden ebenfalls Stechmücken aus Zentralschweden auf SINV untersucht, welche in den Jahren vor, während und nach einem vermuteten Ausbruch im Jahr 2009 gefangen wurden. Mit real-time RT-PCR-positiven Proben wurden Zellkulturen inokuliert, um Virusisolate zu gewinnen. Ziel dieser Untersuchung war es, die Prävalenz in den Mücken zu beschreiben und mit den Daten anderer Untersuchungen zu vergleichen.

2 Literatur

2.1 Alphaviren

2.1.1 Taxonomie der Alphaviren

Alphaviren gehören zur Familie der Togaviren. Diese haben eine behüllte Virusmorphologie, welche bezeichnend für den Namen ist (lat. toga = Mantel). Die Familie besitzt zwei Genera, das Genus *Rubivirus* und das Genus *Alphavirus*. Während das Rötelnvirus der einzige Vertreter der Rubiviren ist, gibt es derzeit 29 bekannte Arten an Alphaviren (Weaver et al. 2005). Dabei können Alphaviren in zwei Gruppen unterteilt werden: arthritogene (Gelenksentzündungen auslösende) und encephalitogene (Gehirnentzündungen auslösende) Alphaviren. SINV gehört neben dem Chikungunya Virus, dem Ross River Virus, dem Barmah Forest Virus, dem O'nyong-nyong Virus und dem Mayaro Virus zu den arthritogenen (Suhrbier et al. 2012). Zurzeit sind fünf SINV-Genotypen bekannt (Lundström & Pfeffer 2010). Das Sindbisvirus ist das Prototypvirus des Genus *Alphavirus*.

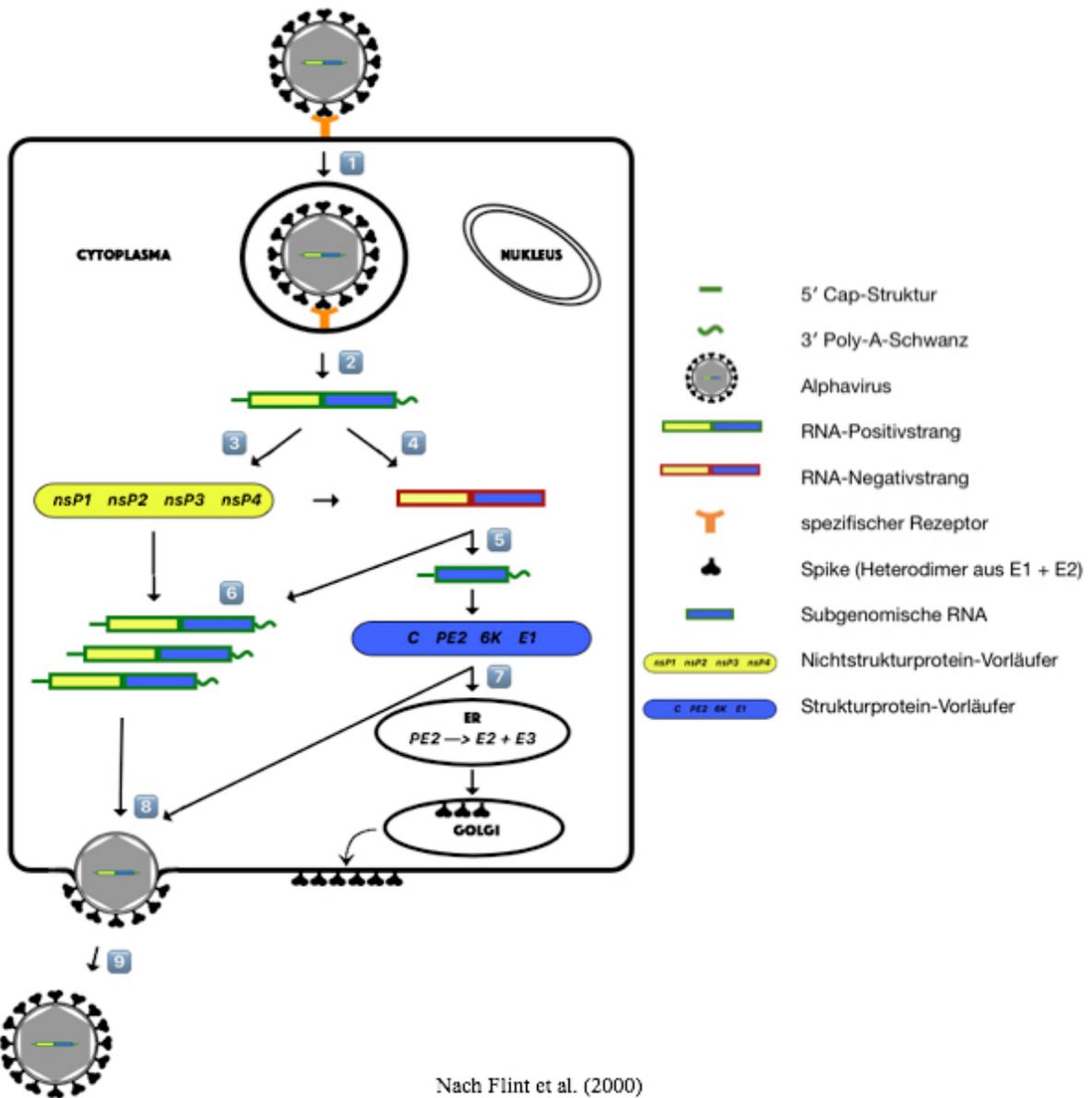
2.1.2 Aufbau und Vermehrung der Alphaviren

Die ca. 70nm großen Virionen der Alphaviren (Rupp et al. 2015) zeichnen sich durch ein ikosaedrisches Kapsid und ein Positivstrang-RNA-Genom aus (Cheng et al. 2016). Ohne die 5'-Cap-Struktur und den 3'-terminalen Poly(A)-Schwanz, ist das SINV-Komplettgenom 11703nt lang (Strauss et al. 1984). Es kodiert für vier Nichtstrukturproteine (nsP1-4) und fünf Strukturproteine (C, E2, E3, 6K, E1) (Rayner et al. 2002, Rupp et al. 2015). Heterodimere der beiden Glykoproteine E1 und E2 sind zu trimären Komplexen (sogenannte Spikes) zusammengelagert und in die Hülle eingebaut, was den Alphaviren eine stachelige Gestalt gibt (Cheng et al 1995, Zhang

et al. 2002). Diese Komplexe sind für die Infektion der Zellen durch rezeptorvermittelte Endozytose wichtig (Mukhopadhyay et al. 2006).

Alphaviren können sowohl Vertebraten als auch Arthropoden infizieren. In Arthropoden kommt es zu einer persistenten Infektion ohne Symptomatik oder erkennbaren Einfluss auf Lebenszeit oder Reproduktionsleistung der Gliederfüßer. Bei Wirbeltieren dagegen kommt es zu einer akuten und meist kurz anhaltenden Infektion. Diese heterogene Reaktion auf das Virus lässt sich auch in Zellkulturen nachvollziehen: Nach einer Infektion mit Alphaviren leben Arthropodenzellen weiter und replizieren weiter das Virus, während eine Infektion bei Vertebratenzellen zum Zelltod führt (Strauss et al. 1984, Strauss & Strauss 1994).

Nach dem erfolgreichen Eindringen in die Zelle und der Freilegung der viralen 49S-RNA, erfolgt zunächst die Translation und Prozession der Nichtstrukturproteine. Diese sorgen für die Replikation der viralen 49S-RNA und die Synthese einer subgenomischen 26S-RNA, welche als Messenger-RNA für die Strukturproteine dient. Somit werden die Strukturproteine erst nach den Nichtstrukturproteinen und der Replikation der viralen 49S-RNA translatiert. Durch Budding (Knospung) werden die Tochterviren aus der Wirtszelle ausgeschleust (Strauss & Strauss 1994). Einen Überblick über die Replikation gibt Abbildung 1:



- 1 Das Alphavirus bindet an einen spezifischen Rezeptor der Wirtszelle, was zu einer rezeptorvermittelten Endozytose führt.
- 2 Der niedrige pH im Endosom führt zu einem strukturellen Umbau und zur Freilegung von einem sogenannten Fusionspeptid. Dieses bildet an der Endosomenmembran eine Pore, durch die das Nukleokapsid (bestehend aus Kapsid und RNA) ins Cytoplasma gelangt. Durch Zersetzung des Nukleokapsides wird die virale Positivstrang-RNA frei.
- 3 Zunächst erfolgt die Translation und Prozessierung der Nichtstrukturproteine von der viralen Positivstrang-RNA.
Diese haben spezifische Funktionen:
 - nsP1 - RNA-Minusstrang-Synthese, RNA-Capping
 - nsP2 - Helikase, Proteinase
 - nsP3 - RNA-Synthese
 - nsP4 - RNA-Polymerase
- 4 Synthese eines RNA-Negativstranges.
- 5 Synthese einer subgenomischen Positivstrang-mRNA mit folgender Translation der Strukturproteine.
- 6 Replikation der Tochter-RNA-Positivstränge.
- 7 Prozessierung der Strukturproteine: Während das Kapsidprotein C die Tochter-RNA-Positivstränge zu Nukleokapsiden verpackt, gelangt der Rest der Strukturproteine (PE2, 6K, E1) in das Endoplasmatische Retikulum (ER), wo sie prozessiert werden. PE2 wird dort zu E2 und E3 gespalten. Im Golgi-Apparat werden die sogenannten „Spikes“ gebildet und gelangen über den Sekretionsweg an die Zellmembran.
- 8 Zusammenbau der Tochterviren: Die neu gebildeten Nukleokapside interagieren mit cytoplasmatischen Domänen der Spikes.
- 9 Ausschleusung der Tochterviren via Budding.

Nach Strauss & Strauss (1994) und Jose et al. (2009)

Abb.1

2.2 Sindbisviren

2.2.1 Geschichte und Epidemiologie des Sindbisvirus

Entdeckt wurde das Sindbisvirus 1952 in Ägypten bei der Untersuchung von Stechmücken in der Nähe des Dorfes Sindbis, welches ca. 30km von Kairo entfernt ist (Taylor et al. 1955). In Europa, Afrika, Asien und Australien wurde SINV in Stechmücken als auch serologisch in verschiedensten Vogelarten nachgewiesen (Hubálek et al. 2008, Buckley et al. 2003, Lundström et al. 2001). Die ersten europäischen SINV-Isolate vom Menschen wurden 2004 von Kurkela et al. beschrieben. Neben Vögeln, Stechmücken und Menschen wurde das Virus bereits aus Fröschen (Kozuch et al. 1978), Fledermäusen (Blackburn et al. 1982) und Zecken (Gresikova et al. 1978) isoliert. Von den arthritogenen Arboviren ist SINV am weitesten verbreitet (Tesh 1982).

Genetisch kann SINV in fünf Genotypen unterschieden werden, die in bestimmten Regionen vorkommen (Lundström & Pfeffer 2010) (Tab. 1 + Abb. 2).

Tabelle 1: Sindbisvirus-Genotypen und deren geographische Verteilung

SINV-Genotyp	Vorkommen
1	Afrika, Europa
2	Australien
3	Süd-Ost-Asien
4	Zentral-Asien
5	Neuseeland

Europäische SINV weisen dabei eine enge Verwandtschaft zu afrikanischen SINV auf (Strauss 1992, Norder et al. 1996). Hierbei werden zwei Wege der Verschleppung diskutiert: SINV-positive Stechmücken könnten durch humane Transportmittel wie z.B. Flugzeuge über weite Strecken verbreitet werden, wie es auch schon für andere Krankheiten wie die Malaria beschrieben wurde (Griffitts & Griffitts 1931, Whitfield et al. 1984). Ebenfalls wird die Verbreitung durch Zugvögel in Betracht gezogen, da SINV in Vögeln eine langanhaltende, periodisch reaktivierbare Virämie auslösen kann (Norder et al. 1996). Zugvögel spielen eine besondere Rolle bei der Verbreitung von Viren, insofern am Ankunftsort kompetente Vektoren vorhanden sind (Aspöck 2007). Hierbei wird von einer sukzessiven Verschleppung von Rastplatz zu Rastplatz der Zugvögel ausgegangen (Wojta & Aspöck 1982). Im Frühjahr kommen SINV-positive Zugvögel in Nordeuropa an, wobei man nicht sicher sagen kann, ob sich diese in Nordeuropa oder in Afrika infiziert haben (Kurkela et al. 2008). Auch Deutsche SINV-Isolate sind phylogenetisch eng mit den Schwedischen verwandt und es wird eine Verbreitung durch Vögel vermutet (Jöst et al. 2010). Die Untersuchungen von Sane et al. (2012b) bestätigen die Verwandtschaft deutscher SINV-Isolate mit Nordeuropäischen. Derzeit ist unklar, ob es zu einem regelmäßigen Eintrag von SINV nach Nordeuropa kommt, oder ob es sich um ein seltenes Ereignis handelt, auch wenn phylogenetische Untersuchungen klar zeigen, dass SINV ursprünglich aus Afrika dorthin gekommen sind (Lundström et al. 2019). Neueste Untersuchungen in diesem Themengebiet lassen jedoch vermuten, dass SINV einmalig aus Afrika nach Schweden verschleppt wurde und sich von dort aus weiter in Europa verbreitet hat (Ling et al. 2019). Abbildung 2 zeigt eine geographische Übersicht von Zugvögel-Flugrouten und das Vorkommen der SINV-Genotypen.

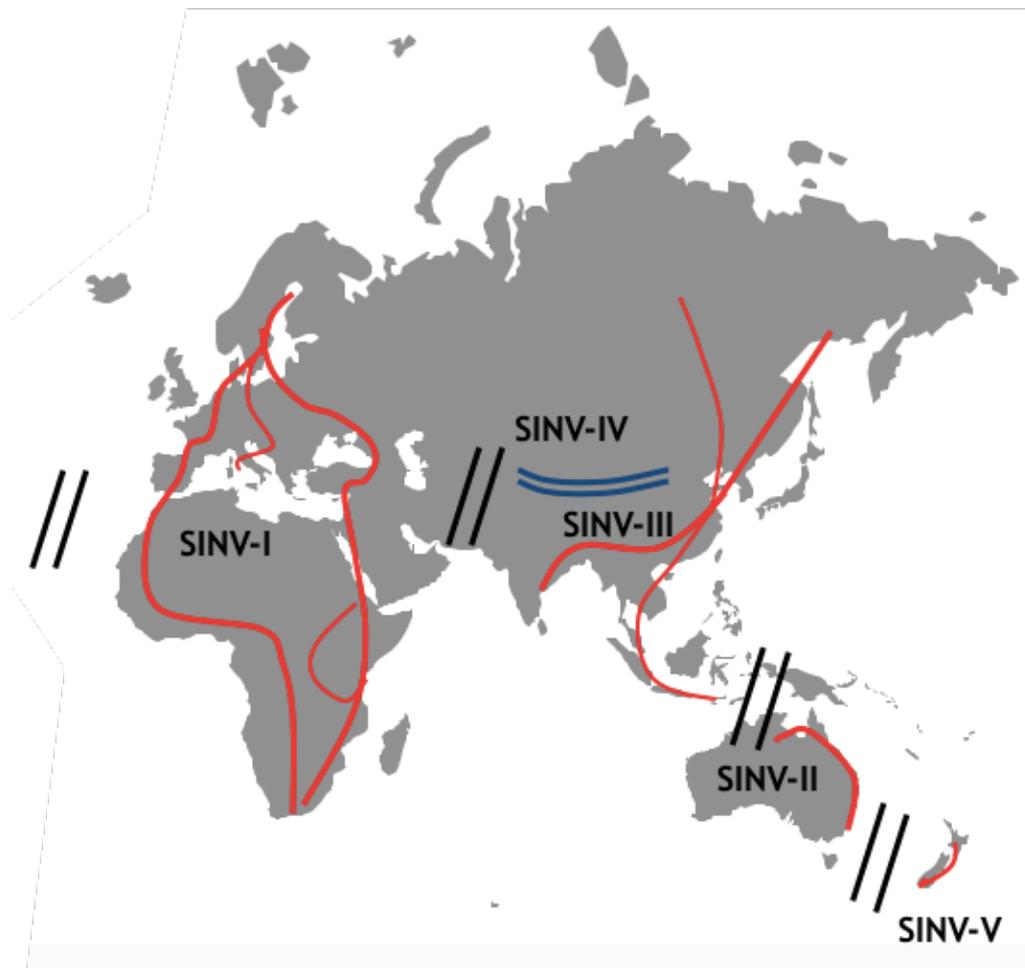


Abb. 2: Die roten Linien stellen die Hauptflugrouten von Zugvögeln dar. Die Doppelstriche symbolisieren geographische Grenzen zwischen den Genotypen (in blau angedeutet: Das Himalaya-Gebirge als natürliche geographische Begrenzung)

2.2.2 Übertragung von Sindbisviren

Da die Übertragung durch Stechmücken erfolgt, zählt man Sindbisviren auch zur Gruppe der sogenannten Arboviren (**arthropod-borne** = durch Gliederfüßer übertragen). Vögel stellen für viele durch Stechmücken übertragene Viren die Hauptwirte dar (Aspöck 2007). Generell erkranken Hauptwirte nicht an den entsprechenden Arboviren. Für gewöhnlich sind Menschen wie auch viele andere Wirbeltiere Gelegenheitswirte, werden also zufällig infiziert. Zumeist führt dies nicht zu akuten klinischen Symptomen, sondern zu inapparenten Erkrankungen (Shope 1994). Vom Gelegenheitswirt ausgehend ist keine Sindbisvirus-Übertragung auf den Hauptwirt möglich, da keine oder nur eine niedrigtitrige Virämie ausgelöst wird (Go et al. 2014). In der Gruppe der Alphaviren gibt es aber auch Vertreter (z.B. Chikungunya Virus), die hochtitrige Virämien beim Menschen verursachen und so beim Vorhandensein kompetenter Vektoren den Menschen zu einem wichtigen Faktor während einer Epidemie werden lassen.

Stechmücken nehmen infiziertes Vogelblut auf, welches dann in ihren Mitteldarm gelangt. Nach der Virusvermehrung in den dortigen Epithelzellen gelangt das Virus in die Hämolymphe und verteilt sich durch die Hämolymphe in andere Gewebe (Cheng et al. 2016). Typischerweise infizieren Arboviren zunächst Blutzellen, den Fettkörper, Nervengewebe und Muskelgewebe und vermehren sich insbesondere im Fettkörper und den Blutzellen bevor die Speicheldrüsen befallen werden (Franz et al. 2015). Bis das Virus aus dem gesaugten Blut in die Speicheldrüsen gelangt und dort in einer für eine Übertragung ausreichenden Menge sezerniert wird, können einige Tage oder Wochen vergehen. Dieser Prozess wird extrinsische (äußere) Inkubation genannt (Shope 1994). Die Virusvermehrung im Vektor als auch die extrinsische Inkubation ist temperaturabhängig und erfolgt schneller bei höheren Temperaturen (Aspöck 2007).

In Schweden stellen insbesondere Vögel der Ordnung Passeriformes (Sperlingsvögel) die Hauptwirte für SINV dar (Lundström et al. 2001). Als SINV-Vektoren sind vier Stechmückenarten von besonderer Bedeutung: Als enzootische Vektoren spielen die ornitophilen Arten *Culiseta morsitans* und *Culex pipiens/Culex torrentium* eine zentrale Rolle. Sie halten durch die Übertragung innerhalb der Vogelpopulation das Virusreservoir aufrecht. *Aedes cinereus* und *Aedes rossicus* dagegen sind als potentielle Brückenvektoren zu betrachten, da sie sowohl von Vögeln als auch von Menschen Blut saugen (Lundström et al. 2013, Hesson et al. 2015). Abbildung 3 stellt diesen komplexen Zusammenhang vereinfacht dar:

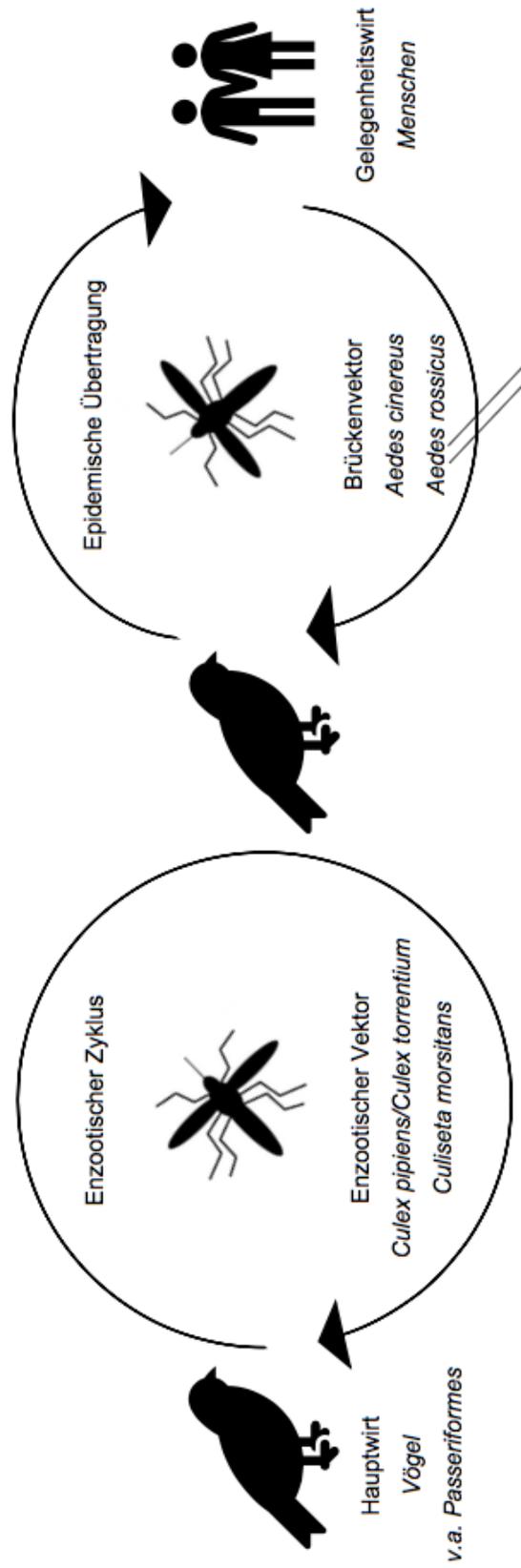


Abb.3: Übertragungszyklus der Sindbisviren

2.2.3 Sindbisviren als Krankheitserreger beim Menschen

2.2.3.1 Pathogenese beim Menschen

Die Übertragung auf den Menschen erfolgt durch Stechmückenstiche. Malherbe et al. (1963) beschrieben als erste den Zusammenhang zwischen SINV-Infektionen und klinischen Symptomen beim Menschen. Conway et al. (2014) beschreiben den Ablauf der Virusanreicherung im gestochenen Wirt folgendermaßen: Infizierte Stechmücken geben beim Saugakt mit Viruspartikeln versetzten Speichel in das Hautgewebe des Wirtes ab. Im Speichel enthaltene Proteasen zersetzen extrazelluläre Hautmatrix, was eine Immunantwort mit folgender Einwanderung von Langerhanszellen hervorruft. Infizierte Langerhanszellen wandern zu den regionalen Lymphknoten, was zur Ausbreitung des Virus im Wirt führt. Daraufhin infiziert das Virus Skelettmuskelzellen, Makrophagen, Synovialzellen und Osteoblasten, was zur Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen wie IL-6, IL-1 β , CCL-2 und RANKL führt. Diese Botenstoffe induzieren ein Inflammationsgeschehen und einen Abbau der Knochenmasse (Chen et al 2015). Auch können im Muskel zytopathische Effekte durch SINV ausgelöst werden (Sane et al. 2012c).

2.2.3.2 Klinik beim Menschen

Die resultierende Krankheit bei einer SINV-Infektion nennt sich Pogosta-Krankheit in Finnland, Ockelbo-Krankheit in Schweden und Karelisches Fieber in Russland (Lvov et al. 1988). Im Durchschnitt sollen nach Turunen et al. (1998) v.a. Personen im Alter von 40 Jahren an SINV-verursachten Symptomen erkranken. Laine et al. (2004) zeigten jedoch auf, dass alle Altersgruppen betroffen sein können. In Afrika scheinen eher Männer betroffen, was durch die häufige Tätigkeit als Farmer und der damit verbundenen erhöhten Stechmückenexposition erklärt werden kann (Storm et al.

2014). Weil in Finnland Frauen zwar häufiger erkranken, Männer jedoch eine höhere Seropositivität aufweisen, wird auch vermutet, dass Männer häufiger einen asymptomatischen Krankheitsverlauf durchleben. Allerdings müsste dieser Zusammenhang durch weitere Untersuchungen näher erforscht werden, bevor hier eine genaue Aussage getroffen werden kann (Kurkela et al. 2008). Die Inkubationszeit wird mit einer Dauer von 8 - 9 Tagen beschrieben (Kurkela et al. 2005). In der akuten Phase kommt es zu Gelenkbeschwerden, juckendem Hautausschlag, Erschöpfung, mildem Fieber, sowie Kopf- und Muskelschmerzen. Am häufigsten bei den Gelenkbeschwerden sind das Sprunggelenk, die Finger, das Handgelenk und die Kniegelenke betroffen, während der Hautausschlag v.a. am Stamm und den Oberschenkeln auftritt (Turunen et al. 1998, Kurkela et al. 2005). Ein Drittel der Erkrankten berichtete von Beschwerden des oberen Respirationstraktes, wobei unklar ist, ob diese direkt durch SINV ausgelöst wurden oder durch Begleitinfektionen anderer Viren (Sane et al. 2011). Während sich die meisten Patienten schnell von der Erkrankung erholen, haben einige länger anhaltende Probleme (Adouchief et al. 2016). In Kindern scheint die Infektion subklinisch oder wenn überhaupt nur mit milden Symptomen zu verlaufen (Laine et al. 2004).

2.2.3.3 Ockelbo-Krankheit in Schweden

In Schweden wurde SINV das erste Mal 1982 von Niklasson et al. (1984) aus *Culiseta spp.* isoliert. Die oben beschriebene Symptomatik ist bereits erstmalig in der zweiten Hälfte der 1960er als „Ockelbo“-Krankheit beschrieben worden, nach dem Ort Ockelbo in Zentralschweden, in dessen Umgebung damals Menschen erkrankten (Skogh and Espmark 1982, Brummer-Korvenkontio et al. 2002). Laut Lundström et al. (1991) sind beide Geschlechter gleich häufig von der Krankheit betroffen, während Ahlm et al.

(2014) bei einer Studie in Nordschweden höhere Prävalenzen bei Männern festgestellt haben. Ein ländlicher Lebensstil und ein geringerer Bildungsgrad wurde in Nordschweden mit einer höheren SINV-Prävalenz in Verbindung gebracht. Ebenfalls beschrieben ist, dass SINV-seropositive Personen öfter erhöhten diastolischen Blutdruck und mehr Bauchfett aufweisen (Ahlm et al. 2014). Im Saisonalen Verlauf sollen zwischen Ende Juli und Anfang Oktober humane Erkrankungen auftreten, mit einem Maximum in der dritten Augustwoche (Lundström et al. 1991). Obwohl die Krankheit in den meisten Teilen Schwedens vorkommt (Lundström et al. 1991), soll es nur alle sieben Jahre zu humanen Ausbrüchen kommen (Turunen et al. 1998, Bergqvist et al 2015). In schwedischen Endemiegebieten werden v.a. bei Vögeln der Ordnung Passeriformes (Sperlingsvögel) Antikörper gegen SINV (Lundström et al. 1992, Lundström et al. 1993) gefunden. Insgesamt können keine zyklischen Unterschiede in der Seropositivität von Vögeln aus Schweden nachgewiesen werden, weshalb sich hier keine Verbindung zum beschriebenen Sieben-Jahres-Zyklus humaner Fälle herstellen lässt (Hesson et al. 2016). Bisherige Studien über Stechmückenprävalenzen zeigen dagegen Parallelen zu humanen Fallzahlen auf. Deshalb wird in Stechmückenprävalenz-Untersuchungen Potential zur Vorhersage humaner Ausbrüche vermutet (Lundström et al. 2019).

2.2.3.4 Diagnostik, Therapie und Prophylaxe von SINV-Erkrankungen

Für die Diagnostik scheint der molekulare Virusnachweis im Serum nicht sinnvoll. Zwar ist SINV während einer akuten Infektion im Blut aufzufinden (Kurkela et al. 2004), jedoch wäre der Nachweis wegen der kurzen und schwachen Virämie nur selten erfolgreich (Sane et al. 2012a). Ein Test auf spezifische IgM-Antikörper per ELISA erwies sich dagegen als sinnvolle Methode zur Frühdiagnostik von Alphaviren

(Calisher et al. 1986). Eine sichere Diagnose einer SINV-Infektion erfordert nach Manni et al. (2008) jedoch zusätzliche Untersuchungen: Zum einen kann ein vierfacher Titeranstieg von IgG in einer zweiten, später im Krankheitsverlauf entnommenen Serumprobe beweisend sein. Auch kann anhand eines negativen oder grenzwertigen IgG-Titers eine bestehende SINV-Immunität durch eine frühere Infektion ausgeschlossen und dadurch bewiesen werden, dass eine akute Infektion vorliegt.

Derzeit steht keine spezifische Therapie zur Verfügung. Schmerzmittel und nicht-steroidale Entzündungshemmer kommen zum Einsatz (Adouchief et al. 2016). Wegen der ähnlich ablaufenden Pathogenese, kann davon ausgegangen werden, dass die bei einer rheumatoiden Arthritis üblichen Medikamente auch gegen den Alphavirus-induzierten Knochengewebsabbau eingesetzt werden können (Chen et al. 2015).

Es gibt keinen Impfstoff und auch keine spezifischen antiviralen Mittel, die zur Prävention oder Behandlung von SINV-verursachten Krankheiten genutzt werden können. Deshalb ist es für die Vermeidung von Krankheitsfällen sehr wichtig, dass sich Personen während eines Aufenthaltes im Freien in SINV-Endemiegebieten oder Gegenden mit hohem Stechmückenvorkommen vor Stichen schützen (Sane et al. 2011)

2.3 Stechmücken

2.3.1 Taxonomie, Entwicklung und Anatomie der Stechmücken

Die Familie der Culiciden (Stechmücken) umfasst ca. 3.500 Arten (Foster & Walker 2019) und gehört zur Ordnung der Diptera (Zweiflügler), Unterordnung Nematocera (Mücken). Sie teilt sich in zwei Unterfamilien auf: *Anophelinae* (Fiebermücken) und *Culicinae* (Aspöck 2008). Fossile Funde belegen die Existenz von Stechmücken vor bereits Millionen von Jahren (Borkent & Grimaldi 2004, Harbach 2007). Mit über 3.500 Arten weltweit bilden die *Culicidae* die größte Gruppe an blutsaugenden Insekten (Becker et al. 2014).

Stechmücken durchleben während ihrer Entwicklung eine komplette Metamorphose: Vom anfänglichen Eistadium über vier Larvenstadien und einem Puppenstadium zum Adulten. Weibliche Vertreter der Familie nehmen Blut zu sich und haben lange, ungegliederte Stechrüssel mit stechend-saugenden Mundwerkzeugen, während die Männchen zurückgebildete Mundwerkzeuge haben und keine Blutmahlzeiten zu sich nehmen. Im Stechrüssel gibt es zwei getrennte Rohre für die Nahrungsaufnahme und die Speichelabgabe (Krenn und Aspöck 2010). Man zählt Stechmücken zu den periodisch-temporären Ektoparasiten. Periodisch, da nur ein Entwicklungsstadium Blut saugt (adulte Weibchen) und temporär, weil sie nicht dauerhaft auf dem Wirt parasitieren, sondern diesen nur zu Blutmahlzeiten aufsuchen (Aspöck 2007). Alle Arthropoden sind ektotherm, was bedeutet, dass sie von ihrer Umgebungstemperatur abhängig sind (Aspöck 2008).

2.3.2 Wirtsfindung und Stechakt

Im Alltag werden Stechmücken vor allem als Lästlinge wahrgenommen, welche Lärm und juckende Stiche verursachen. Schon im Altertum wurde von Stechmückenplagen berichtet (Müller 1968). Jedoch verursachen nicht alle Arten Lärm und nur ein paar sind kompetente Vektoren humaner Krankheiten (Schäfer et al. 2004). Bei der Suche nach einem geeigneten Wirt spielen olfaktorische Reize die Hauptrolle. Es gibt drei Quellen für vom Wirt ausgehende olfaktorische Reize: Schweiß, ausgeatmete Luft und Urin. Man unterscheidet zwischen Langstrecken- und Kurzstrecken-Anlockung durch den Wirt, wobei CO₂ bei beiden Wegen eine Rolle spielt (Takken 1991). CO₂ steigert die Stechmückenaktivität (Roessler 1961) und zusammen mit anderen riechenden organochemischen Verbindungen lockt es sie auch an (Takken 1991). Milchsäure ist hierbei neben anderen anlockenden Säuren wie Ameisensäure, Essigsäure und Propionsäure der wichtigste Lockstoff (Müller 1968). Auch Wärme und Feuchtigkeit führen zum Landen von Stechmücken auf dem Wirt (Laarman 1958). Die Wirtsfindung läuft nach Müller (1968) in einer bestimmten Reihenfolge an Reflexen und Verhaltensweisen ab: 1. Aufsuchen des Wirtshabitats; 2. Auffinden des Wirtes im Flug; 3. Niederlassen auf dem Wirt; 4. Einstich; 5. Speichelabsonderung; 6. Saugen. Hudson et al. (1960) haben in ihren Versuchen bei Stechmücken die Speicheldrüsen entfernt. Hierbei haben sie zum einen herausgefunden, dass die Stiche ohne den Speichel stärker geschmerzt haben und zum anderen, dass es ohne Speichel nicht zu Hautirritationen kommt. Dies impliziert, dass der Speichel eine lokalanästhetische Wirkung hat und es nach einem Stich zu einer Immunreaktion mit spezifischen Antikörpern gegen den Stechmückenspeichel kommt. Schneider und Higgs (2008) haben diese Immunantwort auf einen Mückenstich genauer beschrieben. Nach einer Langzeitexposition kann es auch zu einer Desensibilisierung kommen (Peng & Simons 1998, Peng et al. 2004). Eine Erklärung für die Kreuzreaktivität bei Stichen durch

verschiedene Stechmückenarten ist, dass die gleichen Speichelkomponenten als Antigene fungieren (Peng & Simons 1998).

2.3.3 Stechmücken-Arten und Verbreitung in Schweden

Beide erwähnten Unterfamilien (*Anophelinae* und *Culicinae*) kommen in Schweden vor (Dahl 1977). In ganz Schweden sind derzeit 49 Stechmückenarten bekannt (Lundström et al. 2013). Der Fluss Dalälven, in dessen Auen die Stechmücken für diese Untersuchung gefangen wurden, verläuft durch die schwedischen Provinzen Dalarna, Gävleborg, Uppland und Västmanland. Die Anzahl der nachgewiesenen Stechmückenarten in den jeweiligen Provinzen variiert nach Lundström et al. (2013) zwischen 21 und 32 Arten. Nach Schäfer et al. (2004) nimmt die Anzahl der Arten von Nordschweden nach Südschweden zu und die Stechmückenarten können nach folgenden Kriterien in Gruppen unterteilt werden: Eiablageort (Wasser oder Land), Überwinterungsstadium (Ei, Larve oder Weibchen), bevorzugter Wirt für die Blutmahlzeit (Säugetiere, Vögel, Amphibien) und nach der Anzahl der Generationen pro Saison (eine oder mehrere). Die Gruppenanzahl folgt wie die Artenvielfalt der Stechmücken dem Nord-Süd-Gradient und dies soll als Sinnbild eines ökologischen Musters für Schweden aufgefasst werden können (Schäfer 2004). In den Überschwemmungsregionen des Flusses Dalälven wird die Vermehrung der Stechmücken durch das Ausmaß der Überschwemmungen und vorangegangener Niederschläge beeinflusst (je mehr Überschwemmungen/Niederschläge, desto mehr Mücken). Außerdem erreicht die Stechmückensaison in nördlichen Klimazonen ihren jährlichen Gipfel im Juli und August (Schäfer et al. 2008).

Culiseta morsitans und *Culex pipiens/Culex torrentium* sind wie bereits erwähnt als enzootische Vektoren und *Aedes cinereus* sowie *Aedes rossicus* als Brückenvektoren

zu betrachten (Lundström et al. 2013, Hesson et al. 2015). Verglichen mit *Culex pipiens* ist *Culex torrentium* der scheinbar bessere Vektor für SINV (Lundström et al. 1991). In Schweden kommt *Cx. torrentium* häufiger vor als *Cx. pipiens* (Hesson et al. 2014). Die Unterscheidung ist bei Larven und Weibchen von *Cx. pipiens/Cx. torrentium* morphologisch sehr schwer (Hesson et al. 2014), weshalb eine verlässliche Identifizierung nur bei den Männchen möglich ist (Hesson et al. 2011) und in dieser Studie darauf verzichtet wurde.

3 Material und Methoden

3.1 Sammeln der Stechmücken

Die Stechmücken wurden in den Jahren 2008 bis 2010 im zweiwöchigen Turnus von Mai bis September in Zentralschweden gefangen. Hierbei wurden 35 Lichtfallen mit dem Lockmittel Kohlenstoffdioxid an den Überschwemmungsebenen des Flusses Dalälven platziert, wie bereits beschrieben (Lundström et al. 2013, Hesson et al. 2015). Die morphologische Stechmückenbestimmung wurde an der Universität in Uppsala auf der Basis vorheriger Studien (Schäfer et al. 2008) durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte auf einem Kühltisch und anschließend wurden die sortierten Pools bei -80°C gelagert. Ein Teil der gesammelten Stechmücken wurde nicht in dieser Arbeit, sondern bereits in einer vorherigen Studie untersucht. Hierbei handelt es sich ausschließlich um *Culex pipiens/Cx. torrentium*- und *Culiseta morsitans*-Proben aus dem Jahr 2009 (siehe Hesson et al. 2015 und Tabelle 6).

3.2 Homogenisieren der Stechmückenproben und RNA-Extraktion

Die *Culex pipiens/Cx. torrentium*- und *Culiseta morsitans*-Proben wurden im Hinblick darauf einzeln verarbeitet, dass diese potentielle enzootische Vektoren darstellen. Als potentielle Brückenvektoren wurden die *Aedes cinereus*- und *Aedes rossicus*-Proben in Pools einer Größe von 2 bis 50 Stechmücken homogenisiert. Diese Pools bestanden aus Stechmücken derselben Spezies, welche am selben Platz und in ein und derselben Woche gefangen wurden, was die unterschiedlichen Poolgrößen erklärt. Die Stechmücken wurden mit 600µl PBS (phosphate buffered saline) und 0,5g sterilen Keramikügelchen (1,4mm Durchmesser, Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) in einem Precellys® 24 Homogenisator (Programm: 2x30 sec, 5.000 rpm, 15 sec Pause) homogenisiert. Die RNA wurde aus je 140µl des Homogenats

extrahiert. Hierfür wurde das QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) wie vom Hersteller beschrieben verwendet, mit einem Endvolumen von 60µl Elutionspuffer. Um Kontaminationen zu verhindern wurden maximal 23 Proben plus eine Aufreinigungskontrolle (PCR-Wasser) auf einmal bearbeitet.

3.3 Nachweis von Sindbisvirus mittels real-time RT-PCR

Zum Virusnachweis wurde eine real-time RT-PCR durchgeführt, welche ein 134bp-Fragment vom Nicht-Strukturprotein 1 des SINV nachweist. Es wurde das QuantiTect Probe RT-PCR Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet mit einem Endvolumen von 20µl, welches 2µl Template, 0,75µM von jedem Primer und 0,3µM der Sonde enthält. Die Primer und die Sonde wurden nach (Jöst et al. 2010) ausgewählt. Die Zykluseinstellungen in dieser one-step real-time RT-PCR wurden ebenso weitestgehend übernommen (Sane et al. 2011) (Tabelle 2).

Alle PCRs wurden in einem MX 3000P QPCR System durchgeführt mit der zugehörigen MxPro QPCR Software (Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn, Deutschland). Bei jedem PCR-Durchlauf wurde eine Positivkontrolle (SINV-Isolat aus vorherigen Studien, Lundström et al. 2019) und eine Negativkontrolle (PCR-Wasser) mitgeführt. Die RNA-Proben wurden für die real-time RT-PCR in 2er Pools zusammengefasst und Virus-positive Pools wurde einzeln wiederholt. Bei einem Signal bis zum 43. Zyklus wurden die Proben als SINV-positiv eingestuft.

Tabelle 2

SINV real-time RT-PCR:

Zusammensetzung PCR Mastermix		
Vorwärtsprimer	Sind F	5'-CAC WCC AAA TGA CCA TGC-3'
Rückwärtsprimer	Sind R	5'-KGT GCT CGG AAW ACA TTC-3'
Sonde	Sind P	5'-6FAM-CAG AGC ATT TTC GCA TCT GGC-- BHQ1-3'
(Jöst et al. 2010)		
Zyklusbedingungen		
Reverse Transkription	Zyklusanzahl	1
	Zieltemperatur	50°C
	Inkubationszeit	0:30:00
Prädenaturierung	Zyklusanzahl	1
	Zieltemperatur	95°C
	Inkubationszeit	0:15:00
Amplifikation	Zyklusanzahl	45
Denaturierung	Zieltemperatur	94°C
	Inkubationszeit	0:00:15
Annealing /Elongation	Zieltemperatur	60°C
	Inkubationszeit	0:01:00
(In Anlehnung an Sane et al. 2011)		

3.4 Viruskultivierung

Bei den Proben, die in der real-time RT-PCR positiv waren, wurde versucht das Virus in Vero B4 Zellen zu isolieren. Das Viruskulturmedium war zu gleichen Teilen zusammengesetzt aus Ham's F12 und IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (Life Technologies Europe BV, Bleiswijk, Niederlande) sowie 5 % FKS (Fetales Kälber Serum, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Per konventioneller PCR wurde die Zellkultur vorab auf *Mycoplasma spp.* getestet (VenorGeM® Mykoplasmen-Diagnostikkit, Biochrom, Berlin, Deutschland). Die Infektionen wurden in Zellkulturflaschen (25cm² Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) mit 100µl der Mückenhomogenisate zusammen mit 1,5ml Kulturmedium durchgeführt. Bevor diese Mischung auf den Monolayer pipettiert wurde, wurde sie gefiltert, um Homogenisierungsreste und Bakterien zu entfernen (Porengröße 0,45µm, Filtrier S 0.45 Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland). Das Medium der infizierten Kulturen beinhaltete 3 % FKS und 1 % Antibiotic Antimycotic Solution (10.000U Penicillin, 10mg Streptomycin und 5µg Amphotericin B pro ml, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) um ein Wachstum der inherenten Stechmückenflora zu verhindern. Die inokulierten Zellkulturen wurden täglich im Mikroskop kontrolliert. Wenn nach fünf bis sieben Tagen kein cytopathischer Effekt (CPE) erkennbar war, wurde die entsprechende inokulierte Kultur (blind-) passagiert. Sobald ein CPE auftrat, wurde eine zweite Probe Zellkulturüberstand (160µl pro Kultur) genommen. Wenn nach einer zweiten Passage immer noch kein CPE erkennbar war, wurde dennoch die zweite Überstandsprobe genommen. Alle Überstandsproben wurden aufgereinigt und anschließend wie bereits beschrieben via real-time RT-PCR untersucht, um festzustellen, ob Viruswachstum stattgefunden hatte. Die Zellkulturen mit nachgewiesenem Viruswachstum wurden geerntet, indem der Überstand bis auf einen Rest von ca. 2ml dekantiert und der Monolayer mit einem sterilen Spatel abgeschabt

wurde. Dieses Gemisch aus Überstand und abgelösten Zellen wurden in Kryogenröhrchen zusammen mit 20 % FKS bei -80°C eingelagert.

3.5 Statistische Analyse

Um die Populationsgrößen der verschiedenen Jahre zu vergleichen wurde der T-test ($\alpha = 0,05$) verwendet. Die Confidenzintervalle (95%CI) für die Prävalenzen bei einer Probengröße über 1000 Stechmücken wurden mit der Wilson Methode berechnet, wofür EpiTools epidemiological calculators (AusVet, Animal Health Services, Australien) verwendet wurde. Dagegen wurde der 95%CI-Wert für die Prävalenzen der Probengrößen bis 1000 Stechmücken per Clopper und Pearson Methode bestimmt. Hierbei wurde die Graph Pad Software (Graph Pad Software Inc., San Diego, Ca., USA) benutzt. Außerdem wurde diese Software zur Bestimmung der MIRs (Minimum infection rate) verschiedener Fangstellen verwendet. Um die Unabhängigkeit vergleichener Prävalenzen zu testen, wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson mit einem Typ I-Fehler von 0,05 durchgeführt. Bei kleinen Probengrößen ($n = < 30$) wurde der Exakte Test nach Fisher verwendet. Die Bonferroni Korrektur wurde zur Kontrolle des Chi-Quadrat-Tests herangezogen und für mehrere Werte berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Sammeln der Stechmücken

In dieser Studie wurden 80.524 aus Zentralschweden stammende Stechmücken weiterverarbeitet. Von diesen 80.524 Stechmücken wurden 24.243 im Jahr 2008 gesammelt, 45.285 im Jahr 2009 und 10.996 im Jahr 2010. Im monatlichen Vergleich wurden insgesamt 29 im Mai gefangen (2008: n = 23, 2009: n = 0, 2010: n = 6), 8.636 im Juni (2008: n = 3.458, 2009: n = 2.791, 2010: n = 2.387), 32.337 im Juli (2008: n = 14.508, 2009: n = 11.170, 2010: n = 6.659), 28.649 im August (2008: n = 3.570, 2009: n = 23.284, 2010: n = 1.795) und 10.873 im September (2008: n = 2.684, 2009: n = 8.040, 2010: n = 149).

Nach Spezies sortiert wurden 37.593 *Aedes cinereus* (2008: n = 11.744, 2009: n = 20.196, 2010: n = 5.653), 42.645 *Aedes rossicus* (2008: n = 12.362, 2009: n = 25.031, 2010: n = 5.252), 148 *Culex pipiens/Cx. torrentium* (2008: n = 79, 2009: n = 19, 2010: n = 50) und 138 *Culiseta morsitans* (2008: n = 58, 2009: n = 39, 2010: n = 41) identifiziert. Wegen des bereits erwähnten Pooling-Systems resultierten daraus 1.135 *Aedes cinereus*- und 1.122 *Aedes rossicus*-Pools. Der T-Test zeigte, dass kein signifikanter Unterschied der Spezieshäufigkeit zwischen den verschiedenen Jahren bestand. Folglich sind die untersuchten Populationsgrößen vergleichbar.

4.2 SINV Detektion mittels real-time RT-PCR

Insgesamt wurde mit 2.543 Proben eine real-time RT-PCR durchgeführt (2008: n = 911; 2009: n = 1.213; 2010: n = 419). Von diesen Proben zeigten 60 (2,36 %; 95%CI: 1,81 - 3,03) ein Signal. Wie in Tabelle 3 ersichtlich wird, waren im Jahr 2008 24 von 911 Proben positiv (2,63 %, 95%CI: 1,70 - 3,89), im Jahr 2009, 35 von 1.213 Proben

(2,89 %, 95%CI: 2,02 - 3,99) und 2010 eine von 419 Proben (0,24 %, 95%CI: 0,01 - 1,32). Bezogen auf die Prävalenz der verschiedenen Jahre, waren 2010 signifikant weniger positive Proben als 2008 oder 2009 ($p = 0.006957$).

Von den 1.135 *Ae. cinereus* Pools waren 19 SINV-positiv (1,67 %, 95%CI: 1,01 - 2,60), von den 1.122 *Ae. rossicus* Pools 40 (3,57 %, 95%CI: 2,56 - 4,82), von den 148 *Cx. pipiens/Cx. torrentium* Pools einer (0,68 %, 95%CI: 0,02 - 3,71) und von den 138 *Cs. morsitans* Pools keiner (0,00 %, 95%CI: 0,00 - 2,64) (Tabelle 3). Wenn man die Spezies untereinander vergleicht, wurde SINV signifikant häufiger in *Aedes spp.* als in *Culiseta/Culex spp. gefunden* ($p = 0.030$).

Die SINV-Prävalenz in den verschiedenen Monaten der Stechmücken-Fangaison zeigte, dass 5 der 60 positiven Poolproben im Juni gesammelt wurden (8,33 %, 95%CI: 2,76 - 18,39), 14 im Juli (23,33 %, 95%CI: 13,38 - 36,04), 27 im August (45 %, 95%CI: 32,12 - 58,39) und 14 im September (23,33 %, 95%CI: 13,38 - 36,04). Im Mai gab es keine positive Probe. Zusätzlich wurden die Prävalenzen mit der minimalen und maximalen Anzahl positiver Stechmücken bestimmt und nicht nur wie zuvor beschrieben die Poolprobenprävalenz pro Monat (Tabelle 4).

Fangstellen, von denen Stechmücken positiver Pools stammen, wurden hinsichtlich der insgesamt dort gefangenen Stechmückenanzahl einer Stechmückenart, der resultierenden Poolmenge, insgesamt positiver Pools dieser Stelle und der resultierenden MIR (Minimum Infection Rate) verglichen (Tabelle 5).

Tabelle 3: Prävalenzen der SINV-positiven Proben

Fangjahr	2008		2009		2010		Gesamt	
	Positive Proben/Untersuchte Proben	Prävalenz (95% Konfidenzintervall)						
<i>Aedes cinereus</i>	7 / 414	1,69 % (95%CI: 0,68 - 3,45)	12 / 541	2,22 % (95%CI: 1,15 - 3,84)	0 / 180	0 % (95%CI: 0,00 - 2,03)	19 / 1135	1,67 % (95%CI: 1,01 - 2,60)
<i>Aedes rossicus</i>	16 / 360	4,44 % (95%CI: 2,56 - 7,12)	23 / 614	3,75 % (95%CI: 2,39 - 5,57)	1 / 148	0,68 % (95%CI: 0,02 - 3,71)	40 / 1122	3,57 % (95%CI: 2,56 - 4,82)
<i>Culiseta morsitans</i>	0 / 58	0 % (95%CI: 0,00 - 6,16)	0 / 39	0 % (95%CI: 0,00 - 9,03)	0 / 41	0 % (95%CI: 0,00 - 8,60)	0 / 138	0 % (95%CI: 0,00 - 2,64)
<i>Culex pipiens/torrentium</i>	1 / 79	1,27 % (95%CI: 0,03 - 6,85)	0 / 19	0 % (95%CI: 0,00 - 17,65)	0 / 50	0 % (95%CI: 0,00 - 7,11)	1 / 148	0,68 % (95%CI: 0,02 - 3,71)
Gesamt	24 / 911	2,63 % (95%CI: 1,70 - 3,89)	35 / 1213	2,89 % (95%CI: 2,02 - 3,99)	1 / 419	0,24 % (95%CI: 0,01 - 1,32)	60 / 2543	2,36 % (95%CI: 1,81 - 3,03)

Tabelle 4: SINV-Prävalenzen bezogen auf die Fangmonate

Fangmonat	2008				2009			
	Minimum an positiven Stechmücken/ Stechmücken dieses Monats	Prävalenz (95% Konfidenzintervall)	Maximum an positiven Stechmücken/ Stechmücken dieses Monats	Prävalenz (95% Konfidenzintervall)	Minimum an positiven Stechmücken/ Stechmücken dieses Monats	Prävalenz (95% Konfidenzintervall)	Maximum an positiven Stechmücken/ Stechmücken dieses Monats	Prävalenz (95% Konfidenzintervall)
Mai	0 / 23	0,00 % (95%CI: 0,00 - 14,31)	0 / 23	0,00 % (95%CI: 0,00 - 0,14)	-	-	-	-
Juni	1 / 3458	0,04 % (95%CI: 0,00-0,16)	1 / 3458	0,04 % (95%CI: 0,00 - 0,16)	3 / 2794	0,11 % (95%CI: 0,04 - 0,32)	59 / 2794	2,11 % (95%CI: 1,64 - 2,71)
Juli	9 / 14508	0,06 % (95%CI: 0,03 - 0,12)	254 / 14508	1,75 % (95%CI: 1,55 - 1,98)	5 / 11174	0,04 % (95%CI: 0,02 - 0,10)	163 / 11174	1,46 % (95%CI: 1,25 - 1,70)
August	13 / 3570	0,36 % (95%CI: 0,21 - 0,62)	349 / 3570	9,78 % (95%CI: 8,84 - 10,79)	14 / 23284	0,06 % (95%CI: 0,04 - 0,10)	608 / 23284	2,61 % (95%CI: 2,41 - 2,82)
September	1 / 2684	0,04 % (95%CI: 0,01 - 0,21)	50 / 2684	1,86 % (95%CI: 1,42 - 2,45)	13 / 8040	0,16 % (95%CI: 0,04 - 0,28)	575 / 8040	7,15 % (95%CI: 6,61 - 7,74)

Fangmonat	2010				Insgesamt			
	Minimum an positiven Stechmücken/ Stechmücken dieses Monats	Prävalenz (95% Konfidenz intervall)	Maximum an positiven Stechmücken/ Stechmücken dieses Monats	Prävalenz (95% Konfidenz intervall)	Minimum an positiven Stechmücken/ Stechmücken dieses Monats	Prävalenz (95% Konfidenz intervall)	Maximum an positiven Stechmücken/ Stechmücken dieses Monats	Prävalenz (95% Konfidenz intervall)
Mai	0 / 6	0,00 % (95%CI: 0,00 - 39,03)	0 / 6	0,00 % (95%CI: 0,00 - 39,03)	0 / 29	0,00 % (95%CI: 0,00 - 11,70)	0 / 29	0,00 % (95%CI: 0,00 - 11,70)
Juni	1 / 2387	0,04 % (95%CI: 0 ,01 - 0,24)	50 / 2387	2,09 % (95%CI: 1,59 - 2,75)	5 / 8636	0,06 % (95%CI: 0,02 - 0,14)	110 / 8636	1,27 % (95%CI: 1,06 - 1,53)
Juli	0 / 6659	0,00 % (95%CI: 0,00 - 0,06)	0 / 6659	0,00 % (95%CI: 0,00 - 0,06)	14 / 32337	0,04 % (95%CI: 0,03 - 0,07)	467 / 32337	1,44 % (95%CI: 1,32 - 1,58)
August	0 / 1795	0,00 % (95%CI: 0,00 - 0,21)	0 / 1795	0,00 % (95%CI: 0,00 - 0,21)	27 / 28649	0,09 % (95%CI: 0,06 - 0,14)	957 / 28649	3,34 % (95%CI: 3,14 - 3,55)
September	0 / 149	0,00 % (95%CI: 0,00 - 2,51)	0 / 149	0,00 % (95%CI: 0,00 - 2,51)	14 / 10873	0,13 % (95%CI: 0,04 - 0,22)	625 / 10873	5,75 % (95%CI: 5,33 - 6,20)

Tabelle 5: Fangstellenvergleich der positiven Stechmückenpools

Mückenart	Fangstelle	Pools pro Stelle	Stechmücken pro Stelle	Positive Pools pro Stelle	Poolgröße der positiven Pools	MIR (Minimum Infection Rate)
<i>Ae. cinereus</i>	Sonnbo	65	2785	1	50	0,04 - 1,80
	Grimsarbo Mehedeby	57	2525	1	50	0,04 - 1,98
	Fågle	52	1954	1	50	0,05 - 2,56
	Näckenbäck	46	1868	1	50	0,05 - 2,68
	Hedesunda Sandräsbadet	47	1768	1	3	0,06 - 0,17
	Valmbäcken	38	1509	1	50	0,07 - 3,31
	Ista	32	922	1	3	0,11 - 0,33
	Nationalparken 1 Ormpussen	80	3502	4	50; 50; 50; 50	0,11 - 5,71
	Valmbäcken G	19	810	1	22	0,12 - 2,72
	Mattön	37	1260	2	1; 50	0,16 - 4,05
	Nationalparken 2 Lindängsbäcken	29	806	2	10; 50	0,25 - 7,44
	Sevallbo	12	108	1	5	0,93 - 4,63
	Valmbäcken C	7	74	1	5	1,35 - 6,76
	Pelarsalen G	4	9	1	2	11,11 - 22,22
<i>Ae. rossicus</i>	Nationalparken 2 Lindängsbäcken	96	4115	1	7	0,02 - 0,17

<i>Ae. rossicus</i>	Fågle	79	3560	1	31	0,03 - 0,87
	Ista	79	3441	1	50	0,03 - 1,45
	Mattön	55	2474	1	7	0,04 - 0,28
	Koversta Camping	65	2722	1	36	0,04 - 1,32
	Gysinge Sägviken	57	2354	1	50	0,04 - 2,12
	Valmbäcken	57	2486	2	50; 50	0,08 - 4,02
	Näckenbäck	54	2238	3	50; 50; 50	0,13 - 6,70
	Grimsarbo Mehedeby	77	3432	5	27; 50; 50; 50; 50	0,15 - 6,61
	Bännbäck	31	1101	2	6; 42	0,18 - 4,36
	Ormpussen	12	562	1	50	0,18 - 8,90
	Nationalparken 1 Ormpussen	106	3472	9	17; 50; 50; 50; 50; 50; 50; 50; 50	0,26 - 12,01
	Valmbäcken G	45	2037	6	29; 37; 50; 50; 50; 50	0,29 - 13,06
	Hallarsjö	18	330	1	50	0,3 - 15,15
	Österfärnebo Norrån	17	320	1	1	0,31
	Tärnsjö Nordmyra	13	173	2	1; 11	1,16 - 6,94
	Österfärnebo Samhälle	9	26	1	1	3,85
	Valmbäcken C	7	19	1	4	5,26 - 21,05
<i>Cx. pipiens/ torrentium</i>	Näckenbäck	-	11	1	1	9,09

Tabelle 6: SINV-Prävalenzen unter Berücksichtigung der Stechmücken aus der Studie Hesson et al. (2015)

Fangjahr	2008		2009		2010		Gesamt	
	Positive Proben/Untersuchte Proben	Prävalenz (95% Konfidenzintervall)						
<i>Aedes cinereus</i>	7 / 414	1,69 % (95%CI: 0,68 - 3,45)	12 / 541	2,22 % (95%CI: 1,15 - 3,84)	0 / 180	0 % (95%CI: 0,00 - 2,03)	19 / 1135	1,67 % (95%CI: 1,01 - 2,60)
<i>Aedes rossicus</i>	16 / 360	4,44 % (95%CI: 2,56 - 7,12)	23 / 614	3,75 % (95%CI: 2,39 - 5,57)	1 / 148	0,68 % (95%CI: 0,02 - 3,71)	40 / 1122	3,57 % (95%CI: 2,56 - 4,82)
<i>Culiseta morsitans</i>	0 / 58	0 % (95%CI: 0,00 - 6,16)	14 / 707	1,98 % (95%CI: 1,15 - 3,33)	0 / 41	0 % (95%CI: 0,00 - 8,60)	15 / 816	1,84 % (95%CI: 1,09 - 3,04)
<i>Culex pipiens/torrentium</i>	1 / 79	1,27 % (95%CI: 0,03 - 6,85)	2 / 309	0,65 % (95%CI: 0,02 - 2,49)	0 / 50	0 % (95%CI: 0,00 - 7,11)	2 / 428	0,47 % (95%CI: 0,01 - 1,80)
Gesamt	24 / 911	2,63 % (95%CI: 1,70 - 3,89)	51 / 2171	2,35 % (95%CI: 1,79 - 3,08)	1 / 419	0,24 % (95%CI: 0,01 - 1,32)	74 / 3501	2,11 % (95%CI: 1,68 - 2,65)

4.3 Virusisolation

Die Homogenisate der 60 positiv-getesteten Proben wurden zur in vitro Anzucht in der Zellkultur verwendet. Während der Experimente konnten drei verschiedene Phänomene in den Kulturen beobachtet werden: 1) Manche Kulturen haben einen eindeutigen CPE gezeigt und waren in der durchgeführten real-time RT-PCR SINV-positiv (n = 18). 2) Manche zeigten einen eindeutigen CPE aber waren negativ in der SINV-PCR (n = 11). 3) Die verbliebenen Zellkulturen haben keinen CPE gezeigt und waren in der spezifischen SINV-PCR negativ (n = 31).

Die real-time RT-PCR Ergebnisse zeigten, dass in 18 der 60 infizierten Zellkulturen SINV isoliert werden konnte. Die entsprechenden Zellkulturen zeigten das erste der beobachteten Phänomene und die Überstandsproben hatten in der real-time RT-PCR Ct-Werte von 18 - 23, was einer Steigerung des SINV-Titers um 5 - 7,5 log-Stufen im Vergleich zu den initialen Ct-Werten der Stechmückenpools entspricht. Die Zellkulturen welche das zweite Phänomen aufwiesen wurden bei -80°C eingelagert und einige Zeit später erneut passagiert um zu sehen, ob der CPE reproduzierbar war oder nicht. Überraschenderweise trat der CPE bei allen korrelierenden Proben nicht wieder auf. Die Proben, bei denen das dritte Phänomen in der Zellkultur auftrat, wurden noch einmal der gesamten Virusanzucht-Prozedur unterzogen. Hierbei zeigte keine der Kulturen einen CPE der Vero B4 Zellen und auch der Zellkulturüberstand war für alle SINV-negativ in der real-time RT-PCR.

5 Diskussion

Es wurden 148 *Cx. pipiens/Cx. torrentium* auf SINV untersucht, von denen nur eine SINV-positiv war. Hierbei sollte beachtet werden, dass vor dieser Untersuchung keine Differenzierung zwischen *Cx. pipiens/Cx. torrentium* stattgefunden hat und deshalb nur eine „allgemeine“ Aussage über die beiden *Culex*-Arten getroffen werden kann. Laut Hesson et al. (2015) ist *Cx. torrentium* der enzootische Hauptvektor für SINV. Wie bereits erwähnt, wurden die untersuchten Stechmücken in der Studie von Hesson et al. (2015) zusammen mit den Stechmücken dieser Studie gefangen. Bei der Untersuchung von Hesson et al. (2015) waren von 668 untersuchten *Cx. pipiens/Cx. torrentium*-Proben 14 SINV-positiv und 2 von den 290 *Culiseta morsitans*-Proben.

SINV wurde signifikant häufiger in *Aedes spp.* als in *Culiseta/Culex spp.* gefunden. Das heißt, in den untersuchten Jahren 2008 - 2010 war die Prävalenz in den Brückenvektoren höher als in den enzootischen Vektoren, was einen Anstieg humaner Infektionen in diesem Zeitraum erklären kann. Dies wurde bei Lundström et al. (2019) schon für *Ae. cinereus* beschrieben. Berücksichtigt man die Proben von Hesson et al. (2015), welche zusammen mit den Proben dieser Studie gesammelt wurden, würden sich die Prävalenzen entsprechend verändern (Tabelle 6), die erwähnte Signifikanz zwischen positiven *Aedes spp.* und *Culiseta/Culex spp.* bleibt jedoch bestehen ($p = 0.0213$).

Während des Monitorings 2001 - 2003 wurde *Ae. rossicus* nur im Ausbruchsjahr positiv auf SINV getestet, weshalb davon ausgegangen wurde, dass Untersuchungen von *Ae. rossicus* nicht für Vorhersagen humaner Ausbrüche geeignet sind (Lundström et al. 2019). Nichts desto trotz wurde in der vorliegenden Studie eine hohe SINV Prävalenz in den *Ae. rossicus*-Proben des Ausbruchsjahres als auch des Vorjahres des Ausbruchs ermittelt. Darüber hinaus war diese Prävalenz in *Ae. rossicus* verglichen

mit allen untersuchten Stechmückenarten die höchste. Es gibt bisher nur wenige Studien zur Prävalenz von SINV in *Ae. rossicus*, daher ist es empfehlenswert, *Ae. rossicus* in zukünftige Studien dieses Forschungsbereiches zu inkludieren.

Die Fangstellen, von welchen SINV-positive Proben stammten, wurden verglichen und die MIRs (minimum infection rates) der entsprechenden Pools kalkuliert (Tabelle 5). Dabei hat sich herausgestellt, dass SINV an manchen Orten verhältnismäßig häufiger vorkommt aber diese Unterschiede nicht signifikant waren. Hier sollte bei zukünftigen Studien auch untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der SINV-positiven Stechmücken und der Vogelpopulation bzw. humanen Fallzahlen an den jeweiligen Orten besteht.

Im monatlichen Vergleich der SINV-positiven Poolproben wurden bereits ab Juni positive Stechmücken gefunden und die Anzahl stieg bis August an, um im September wieder leicht abzufallen. Beim Berechnen der Prävalenzen für die minimale und maximale Anzahl positiver Stechmücken innerhalb der positiven Pools, steigt die potentielle Anzahl positiver Stechmücken im Ausbruchsjahr sogar bis September an (Tabelle 4). Dieses Muster passt insgesamt zum bereits erwähnten saisonalen Muster humaner Erkrankungen (Lundström et al. 1991).

Es gibt einige Erklärungen dafür, warum aus manchen real-time RT-PCR positiven Homogenisaten keine Viren in der Zellkultur anzüchtbar waren. Zunächst könnten die viralen Partikel nach der langen Zeit der Lagerung und des Probenhandlings bereits inaktiviert gewesen sein. Hierbei kommen Faktoren wie z.B. das Mischen mit Puffer (Blow et al. 2004), oder antivirale Effekte durch das Stechmückengewebe als Auslöser der Inaktivierung in Frage (Cheng et al. 2016). Auch ist RNA wegen ihrer molekularen Struktur anfälliger für Degradierung als DNA (Alberts et al. 2017) und mehrfache Zyklen an Einfrieren und Auftauen von gering konzentrierten RNA-Proben kann zu

früher Degradierung durch Hydrolyse führen (Olivieri et al. 2014). Zusätzlich könnte es sein, dass in den infizierten Zellkulturen in denen ein CPE stattfand, die Sindbis-spezifische real-time RT-PCR jedoch negativ war, andere virale Pathogene den CPE ausgelöst haben. Außerdem könnte der CPE auch durch toxische Effekte, verursacht durch Stechmückengewebsreste oder Enzyme, ausgelöst worden sein.

In der Humanmedizin spielt das Sindbisvirus eine Rolle als arthritogenes Virus. Da es keine lebensbedrohliche Krankheit auslöst und viele inapparente Fälle auftreten, wird die Erkrankung von Humanmedizinern oft vernachlässigt, wodurch die Diagnose oft recht spät oder auch gar nicht gestellt wird. Das Ziel dieser Studie war es, einen Zusammenhang zwischen der SINV-Prävalenz in Stechmücken und der Anzahl humaner Fallzahlen herzustellen. Eine Vorhersage von Ausbrüchen scheint anhand eines gezielten Prävalenzscreenings in bestimmten Stechmückenpopulationen möglich. Dass sowohl in der Studie von Lundström et al. (2019) als auch bei der vorliegenden Untersuchung hohe SINV-Prävalenzen in den Ausbruchjahren 2002 und 2009 festgestellt wurden, befürwortet den von Turunen et al. (1998) und Berqvist et al. (2015) beschriebenen sieben Jahres Zyklus der humanen Ausbrüche. Falls sich in weiteren Untersuchungen weitere Übereinstimmungen dieses vermuteten Zyklus aufzeigen, könnte auch generell vor Ausbrüchen in den entsprechenden Jahren gewarnt werden.

Eine vorherige Studie über SINV-Vektor-Stechmücken aus Zentralschweden, welche 2001 bis 2003 gefangen wurden, zeigte, dass die SINV Prävalenz im Jahr vor dem humanen Ausbruch niedrig war, im Ausbruchsjahr auf ihren Maximalwert anstieg, um im darauffolgenden Jahr wieder abzufallen (Lundström et al. 2019). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen nahezu das gleiche Prävalenzmuster innerhalb der drei Ausbruch-assozierten Jahre. Einzig die Prävalenz im Vorjahr war etwas höher als

in der vorherigen Untersuchung. Dies stützt die Hypothese, dass ein SINV-Prävalenzscreening in den Vektormücken helfen kann, humane Ausbrüche vorherzusagen, bzw. den sieben-Jahres-Rhythmus anhand der dadurch gesammelten Daten zu bestätigen. Auch könnte ein solches Screening dazu beitragen, Ärzte entsprechend zu sensibilisieren und dadurch die Dunkelziffer an nicht diagnostizierten Fällen zu senken. Die Bevölkerung in Endemiegebieten könnte anhand jährlicher Prävalenzstudien entsprechend informiert werden, z.B. in Jahren mit entsprechend hohen Prävalenzen vermehrt Mückenprophylaxe zu betreiben.

Stechmückenstiche werden hierzulande als Lappalie abgetan, jedoch sollte man sich stetig bewusst sein, dass hinter einem „harmlosen“ Stich mehr stecken kann, als im ersten Moment vermutet wird. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Malaria. In der Vergangenheit war Deutschland bereits Malariaendemiegebiet und trotz der jahrzehntelangen Unterbrechung dieses Malariazyklus, sind die Voraussetzungen für lokale Ausbrüche gegeben (Maier et al. 2003). Da die Malaria klimatisch bedingt geographisch begrenzt vorkommt, ist es durch den Klimawandel durchaus möglich, dass sich diese Grenzen verschieben. Auch die biologische Aktivität der potenten Vektoren ist bei durchgehend höheren Temperaturen gesteigert, sprich die Gefahr einer Übertragung gegeben (Becker et al. 2007). Weiterhin sollten auch die in Europa invasiven Stechmückenarten *Aedes albopictus* (Asiatische Tigermücke) und *Aedes japonicus* (Asiatische Buschmücke) bedacht werden, welche bekannter Weise potente Arbovirus-Vektoren darstellen (Paupy et al. 2009, Schaffner et al. 2011). Beide Arten sind mittlerweile in ganz Europa heimisch und Populationen werden an immer mehr Orten nachgewiesen (Medlock et al. 2015, Zielke et al. 2016). Während die Verbreitung von *Ae. albopictus* scheinbar von der klimatischen Erwärmung profitiert, trifft dies wohl nicht für *Ae. japonicus* zu (Cunze et al. 2016). *Ae. albopictus* wird bei fortschreitender Klimaerwärmung wohl in der Lage sein, sich auch im Norden

Deutschlands fest anzusiedeln (Koch et al. 2016, Walther et al. 2017). Während sich *Ae. albopictus* bereits im Süden Deutschlands reproduzieren und auch nördlich der Alpen überwintern kann, wurde dies auch für Zentraldeutschland (Jena) vermutet (Kuhlisch et al. 2018) und nachgewiesen (Abbildung 4).

Als ein Citizen Science-Projekt wird in Deutschland seit 2012 der „Mückenatlas“ betrieben. Hierbei arbeiten Bürger mit Wissenschaftlern zusammen und fangen im ganzen Land Stechmücken. Somit werden Daten zu den in Deutschland vorkommenden Stechmückenarten wie z.B. deren Verbreitung erhoben, wobei auch eine Ausbreitung der bereits erwähnten invasiven Arten nachvollziehbar ist (mueckenatlas.com). Inwieweit invasive Stechmückenarten nun das Risiko einer SINV-Infektion in Deutschland beeinflussen ist allerdings bislang unbekannt. Die Vektorpotenz für SINV sowie die Auswirkung von Koinfektionen oder sogar Superinfektionen in den Stechmücken mit anderen Arboviren zusammen lassen sich bisher nur im Labor simulieren (Bowers et al. 2003, Muturi & Bara 2015).

Vorkommen der Asiatischen Tigermücke *Aedes albopictus*
in Deutschland; Stand: 15.08.2019
Quelle: Nationale Expertenkommission ‚Stechmücken als
Überträger von Krankheitserregern‘

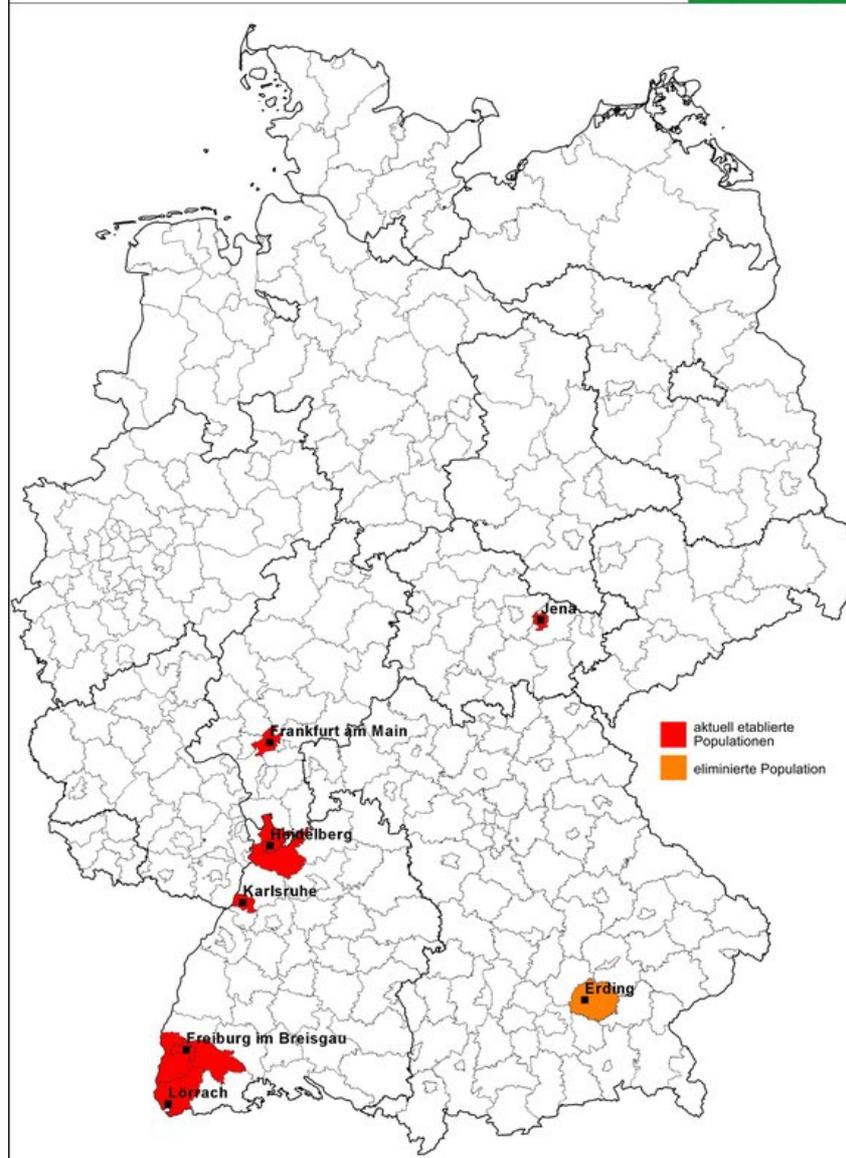


Abb. 4: Aktuelles und früheres Vorkommen von Populationen der Asiatischen Tigermücke (*Aedes albopictus*) in Deutschland auf der Basis von Landkreisen (die komplette Einfärbung von Landkreisen bedeutet nicht zwingend, dass die Tigermücke überall in diesem Landkreis vorkommt). Stand 15.08.2019

(https://www.fli.de/fileadmin/_processed_/f/6/csm_Karte_Ae-albopictus_D_15-08-2019_9f3b74de53.jpg)

Da Jöst et al. (2010), Scheuch et al (2018) und Heym et al. (2019) bereits in Deutschland das Sindbisvirus in Stechmücken nachgewiesen haben, scheint es aber umso wichtiger, Ärzte bezüglich der Symptome von Arboviren zu sensibilisieren. Hierbei sollten auch serologische Untersuchungen bei Patienten mit entsprechenden Beschwerden angeregt werden. Jedoch haben Jöst et al. (2011) anhand SINV-spezifischer serologischer Untersuchungen für Süd-West-Deutschland eine geringe medizinische Bedeutung festgestellt. Für Endemiegebiete wie Zentralschweden ist es jedoch entscheidend, dass bei entsprechenden Symptomen eine SINV-Erkrankung als Differentialdiagnose bedacht werden sollte. Bei deutschen Patienten sollte immer auch ein Auslandsaufenthalt anamnestisch erfragt werden.

Durch den Klimawandel und der damit potentiell einhergehenden Verschiebung von Endemiegebieten bestimmter Krankheiten, sollte ein breiter angelegtes Screening auf Krankheitserreger innerhalb der Stechmückenpopulationen betrieben werden. Nur wenn wir wissen, was durch unsere heimischen Stechmücken übertragen werden kann und ob die entsprechenden Erreger bereits hierzulande in den potenten Vektoren vorkommen, kann die Bevölkerung entsprechend informiert und angemessen Diagnostik, Therapie und Prophylaxe betrieben werden.

6 Zusammenfassung

Johanna Maria Fürst

Untersuchung zur Prävalenz von Sindbisviren in Stechmücken aus Zentralschweden

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

Eingereicht im November 2019

44 Seiten, 6 Tabellen, 4 Abbildungen, 101 Literaturstellen

Schlüsselwörter: Sindbis, Ockelbo, Alphavirus, Arbovirus, *Aedes*, *Culex*, *Culiseta*

Einleitung: Sindbisviren sind durch Stechmücken übertragene Pathogene des Menschen, die in der Alten Welt vorkommen. In Europa sind sie v.a. in den skandinavischen Ländern endemisch, wobei humane Krankheitsfälle in einem Sieben-Jahres-Zyklus verstärkt im Spätsommer auftreten. Die Gründe für dieses Sieben-Jahresintervall sind unbekannt.

Zielstellung: Ziel dieser Untersuchung war es, die Prävalenz in bestimmten Mückenarten im Jahr vor, während und nach einem erwarteten Ausbruchsjahres zu beschreiben.

Material und Methoden: Es wurden 80.524 Stechmücken untersucht, welche in den Jahren vor, während und nach einem vermuteten Ockelbo-Ausbruch im Jahr 2009 gefangen wurden. Zunächst wurden die Proben in 2.543 Pools sortiert, homogenisiert und anschließend die RNA extrahiert. Eine real-time RT-PCR, die ein 134bp-Fragment vom Nicht-Strukturprotein 1 des Sindbisvirus (SINV) amplifiziert, diente zum Nachweis viraler RNA. Mit PCR-positiven Proben wurden Zellkulturen (Vero B4 Zellen) infiziert,

um Virus zu isolieren. Zum Vergleich der gefundenen Prävalenzen in den unterschiedlichen Stechmückenarten und Fangorten wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson und der Exakte Test nach Fisher jeweils mit einem Typ I-Fehler von 0,05 verwendet.

Ergebnisse: Von den insgesamt 2.543 Pool-Proben waren 60 in der real-time RT-PCR positiv. Im Vergleich der einzelnen Jahre untereinander waren 2010 signifikant weniger Proben positiv als 2008 oder 2009. Im Stechmückenspezies-Vergleich wurde SINV signifikant häufiger in *Aedes spp.* als in *Culiseta/Culex spp.* gefunden. In 18 der 60 inokulierten Zellkulturen konnte SINV isoliert, und per real-time RT-PCR das Viruswachstum nachgewiesen werden. Im Vergleich der Fangstellen zeigten einige Orte ein höheres Vorkommen von SINV, allerdings waren diese nicht signifikant. Bei den verschiedenen Stechmückenarten war die höchste SINV-Prävalenz in *Ae. rossicus* zu finden, welche als Brückenvektoren eine wichtige Rolle bei Humaninfektionen einnimmt. Im saisonalen Verlauf sind positive Stechmücken bereits im späten Juni nachweisbar, während die meisten positiven Stechmücken im August und September gefunden werden, dann, wenn auch die menschlichen Erkrankungsfälle auftreten.

Schlussfolgerungen: Die SINV Prävalenz hatte in dem antizipierten Ausbruchsjahr 2009 ihren Maximalwert, aber auch im Vorjahr war eine deutliche Virusprävalenz vorhanden. Im darauffolgenden Jahr, fiel diese jedoch stark ab. Dies unterstützt die Hypothese, dass alle sieben Jahre humane Erkrankungen gehäuft auftreten. Surveillance eignet sich um bereits im Sommer erhöhte Virusaktivität zu erkennen und entsprechende Präventionsmaßnahmen einzuleiten.

7 Summary

Johanna Maria Fürst

Studies on the prevalence of Sindbis virus in mosquitoes from Central Sweden

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

Submitted in November 2019

44 pages, 6 tables, 4 figures, 101 references

Keywords: Sindbis, Ockelbo, Alphavirus, Arbovirus, *Aedes*, *Culex*, *Culiseta*

Introduction: Sindbis viruses are mosquito-transmitted human pathogens, existing in the old world. In Europe it is mainly endemic in Scandinavia, while human cases apparently appear in a seven-year-cycle, especially in the later summer. The reasons of this seven-year-cycle are unknown.

Objective: The aim of this investigation was, to describe the prevalence of SINV in specific mosquitoes in the year before, during and after a supposed outbreak-year.

Material and Methods: 80.524 mosquitoes, that were collected in the year before, during and after the supposed Ockelbo-outbreak in 2009 have been investigated. Initially, the samples have been sorted in 2.543 pools, then homogenized, and subsequently the RNA was extracted. A real-time RT-PCR targeting a 134bp-fragment of the non-structural protein 1 of Sindbis virus (SINV) was performed to detect viral RNA. Cell cultures (Vero B4 cells) have been infected with PCR-positive samples to isolate virus. To compare the detected prevalence in the different mosquito-species and trap sites, Pearson's chi-square-test and Fisher's exact test were used with a type I error α of 0.05 in each case.

Results: Out of 2.543 pool-samples, 60 have been SINV-positive in the real-time RT-PCR. Comparing the years, there were significant fewer positive samples in 2010 than in 2008 or 2009. In mosquito-species comparison, SINV has been found significant more in *Aedes spp.* than in *Culiseta/Culex spp.*. In 18 of the 60 inoculated cell cultures, SINV-isolation succeeded and virus growth was detected via real-time RT-PCR. In comparison of the trap-sites, some places had a higher SINV-rate, but this was not significant. Between the different mosquito-species, *Ae. rossicus* as important bridge-vector in human infection, had the highest SINV-prevalence. In seasonal regime, SINV-positive mosquitoes have been found in the late June already, while the most positive ones were detected in August and September. This is also the time period most human cases appear.

Conclusions: The SINV-prevalence had its maximum value in the anticipated outbreak year 2009, but also in the previous year, there was an obvious detectable prevalence. However, it clearly decreased in the following year. So, the hypothesis of the seven-year-circle of cumulative human cases can be supported. Surveillance is practical to detect higher virus activities already in summertime and therefore, to start with prevention measures.

8 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):221-241.

Ahlm C, Eliasson M, Vapalahti O, Evander M. Seroprevalence of Sindbis virus and associated risk factors in northern Sweden. *Epidemiology & Infection.* 2014;142(7):1559-1565.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molekularbiologie der Zelle.* John Wiley & Sons; 2017

Aspöck H. Klimawandel und die Ausbreitung von Krankheiten: Durch Arthropoden übertragene Infektionen in Mitteleuropa. *Entomologica Romanica.* 2007;343-362.

Aspöck H. Durch Arthropoden übertragene Erreger von Infektionen des Menschen in Mitteleuropa—ein Update. *Mitt. Deut. Gesell. Allg. Ang. Entomol.* 2008;16:371-392.

Becker P, Bucher K, Jendritzky G, Kaminski U, Koppe C, Laschewski. Gesundheitsrisiken durch Klimawandel. *Promet.* 2007;33(3/4):148-156.

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

Bergqvist J, Forsman O, Larsson P, Näslund J, Lilja T, Engdahl C, Lindström A, Gylfe Å, Ahlm C, Evander M, Bucht G. Detection and isolation of Sindbis virus from mosquitoes captured during an outbreak in Sweden, 2013. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 2015;15(2):133-140.

Blackburn NK, Foggin CM, Searle L, Smith PN. Isolation of Sindbis virus from bat organs. *The Central African journal of medicine.* 1982;28(8):201-201.

Blow JA, Dohm DJ, Negley DL, Mores CN. Virus inactivation by nucleic acid extraction reagents. *Journal of virological methods*. 2004;119(2):195-198.

Borkent A, Grimaldi DA. The earliest fossil mosquito (Diptera: Culicidae), in mid-Cretaceous Burmese amber. *Annals of the Entomological Society of America*. 2004;97(5):882-888.

Bowers DF, Coleman CG, Brown DT. Sindbis virus-associated pathology in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*. 2003;40(5):698-705.

Brummer-Korvenkontio M, Vapalahti O, Kuusisto P, Saikku P, Manni T, Koskela P, Nygren T, Brummer-Korvenkontio H, Vaheri A. Epidemiology of Sindbis virus infections in Finland 1981–96: possible factors explaining a peculiar disease pattern. *Epidemiol. Infect.* 2002;129(2):335–345.

Buckley A, Dawson A, Moss SR, Hinsley SA, Bellamy PE, Gould EA. Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *Journal of General Virology*. 2003;84(10):2807-2817.

Calisher CH, El-Kafrawi AO, Mahmud MAD, da Rosa AT, Bartz CR, Brummer-Korvenkontio M, et al. Complex-specific immunoglobulin M antibody patterns in humans infected with alphaviruses. *Journal of clinical microbiology*. 1986;23(1):155-159.

Chen W, Foo SS, Sims NA, Herrero LJ, Walsh, NC, Mahalingam S. Arthritogenic alphaviruses: new insights into arthritis and bone pathology. *Trends in microbiology*. 2015;23(1):35-43.

Cheng RH, Kuhn RJ, Olson NH, Rossmann MG, Choi HK, Smith TJ, Baker TS. Nucleocapsid and glycoprotein organization in an enveloped virus. *Cell*. 1995;80(4):621-630.

Cheng G, Liu Y, Wang P, Xiao X. Mosquito defense strategies against viral infection. *Trends in parasitology*. 2016;32(3):177-186.

Conway MJ, Colpitts TM, Fikrig E. Role of the vector in arbovirus transmission. *Annual review of virology*. 2014;1:71-88.

Cunze S, Koch LK, Kochmann J, Klimpel S. *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus*-two invasive mosquito species with different temperature niches in Europe. *Parasites & vectors*. 2016;9(1):573.

Dahl C. Taxonomy and geographic distribution of Swedish Culicidae (Diptera, Nematocera). *Insect Systematics & Evolution*. 1977;8(1):59-69.

Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM. *Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control*. ASM Press, Washington, DC. 2000;595-628.

Foster WA, Walker ED. Mosquitoes (Culicidae). *Medical and veterinary entomology*. Academic Press. 2019;261-325.

Francy DB, Jaenson TGT, Lundstrom JO, et al.. Ecologic studies on mosquitoes and birds as hosts of Ockelbo virus in Sweden and isolation of Inkoo and Batai viruses from mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. 1989;41(3):355±63.

Franz AW, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes. *Viruses*. 2015;7(7):3741-3767.

Gresikova M, Sekeyova M, Tempera G, Guglielmino S, Castro A (1978). Identification of a Sindbis virus strain isolated from *Hyalomma marginatum* ticks in Sicily. *Acta virologica*. 1978;22(3):231-232

Go YY, Balasuriya UB, Lee CK. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clinical and experimental vaccine research*. 2014;3(1):58-77.

Griffitts THD, Griffitts JJ. Mosquitoes Transported by Airplanes: Staining Method Used in Determining Their Importation. *Public Health Reports (1896-1970)*. 1931;2775-2782.

Harbach RE. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa*. 2007;1668(1):591-538.

Hesson JC, Östman Ö, Schäfer M, Lundström JO. Geographic distribution and relative abundance of the sibling vector species *Culex torrentium* and *Culex pipiens* in Sweden. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2011;11(10):1383-1389.

Hesson JC, Rettich F, Merdić E, Vignjević G, Östman Ö, Schäfer M, et al. The arbovirus vector *Culex torrentium* is more prevalent than *Culex pipiens* in northern and central Europe. *Medical and veterinary entomology*. 2014;28(2):179-186.

Hesson JC, Verner-Carlsson J, Larsson A, Ahmed R, Lundvist A, Lundström JO. *Culex torrentium* mosquito role as major enzootic vector defined by rate of Sindbis virus infection, Sweden, 2009. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(5):875-878.

Hesson JC, Lundström JO, Tok A, Östman Ö, Lundkvist Å. Temporal Variation in Sindbis Virus Antibody Prevalence in Bird Hosts in an Endemic Area in Sweden. *PLoS ONE*. 2016;11(8):e0162005.

Heym EC, Kampen H, Krone O, Schäfer M, Werner D. Molecular detection of vector-borne pathogens from mosquitoes collected in two zoological gardens in Germany. *Parasitology research*. 2019;118(7):2097-2105.

Hubálek Z. Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitology research*. 2008;103(1):29-43.

Hudson A, Bowman L, Orr CWM. Effects of absence of saliva on blood feeding by mosquitoes. *Science*. 1960;131(3415):1730-1731.

Jose J, Snyder JE, Kuhn RJ. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future microbiology*. 2009;4(7):837-856.

Jöst H, Bialonski A, Storch V, Günther S, Becker N, Schmidt-Chanasit J. Isolation and phylogenetic analysis of Sindbis viruses from mosquitoes in Germany. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(5):1900-1903.

Jöst H, Bürck-Kammerer S, Hütter G, Lattwein E, Lederer S, Litzba N, et al. Medical importance of Sindbis virus in south-west Germany. *Journal of Clinical Virology*. 2011;52(3):278-279.

Krenn HW, Aspöck H. Bau, Funktion und Evolution der Mundwerkzeuge blutsaugender Arthropoden. Aspöck H. (Hrsg.): *Krank durch Arthropoden*. Denisia. 2010;30:81-103.

Koch LK, Cunze S, Werblow A, Kochmann J, Dörge DD, Mehlhorn H, Klimpel S. Modeling the habitat suitability for the arbovirus vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Germany. *Parasitology research*. 2016;115(3):957-964.

Kozuch O, Labuda M, Nosek J. Isolation of sindbis virus from the frog *Rana ridibunda*. *Acta virologica*. 1978;22(1):78.

Kuhlisch C, Kampen H, Walther D. The Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Central Germany: Surveillance in its northernmost distribution area. *Acta tropica*. 2018;188:78-85.

Kurkela S, Manni T, Vaeheri A, Vapalahti O. Causative agent of Pogosta disease isolated from blood and skin lesions. *Emerging infectious diseases*. 2004;10(5):889.

Kurkela S, Manni T, Myllynen J, Vaeheri A, Vapalahti O. Clinical and laboratory manifestations of Sindbis virus infection: prospective study, Finland, 2002–2003. *The Journal of infectious diseases*. 2005;191(11):1820-1829.

Kurkela S, Rätti O, Huhtamo E, Uzcátegui NY, Nuorti JP, Laakkonen J, Vapalahti O. Sindbis virus infection in resident birds, migratory birds, and humans, Finland. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(1):41.

Laarman JJ. The host-seeking behaviour of anopheline mosquitoes. *Tropical and geographical medicine*. 1958;10(4):293-305.

Laine M, Luukkainen R, Toivanen A. Sindbis viruses and other alphaviruses as cause of human arthritic disease. *Journal of internal medicine*. 2004;256(6):457-471.

Ling J, Smura T, Lundström JO, Pettersson JHO, Sironen T, Vapalahti O, et al. Introduction and dispersal of Sindbis virus from central Africa to Europe. *J Virol*. 2019;93:e00620-19.

Lundström JO, Vene S, Espmark Å, Engvall M, Niklasson B. Geographical and temporal distribution of Ockelbo disease in Sweden. *Epidemiology & Infection*. 1991;106(3):567-574.

Lundström JO, Turell MJ, Niklasson B. Antibodies to Ockelbo virus in three orders of birds (Anseriformes, Galliformes and Passeriformes) in Sweden. *Journal of wildlife diseases*. 1992;28(1):144-147.

Lundström JO, Turell MJ, Niklasson B. Viremia in three orders of birds (Anseriformes, Galliformes and Passeriformes) inoculated with Ockelbo virus. *Journal of wildlife diseases*. 1993;29(2):189-95.

Lundström JO, Mosquito-borne viruses in Western Europe: A review. *J Vector Ecol*. 1999;24(1):1-39.

Lundström JO, Lindström KM, Olsen B, Dufva R, Krakower DS. Prevalence of Sindbis virus neutralizing antibodies among Swedish passerines indicates that thrushes are the main amplifying hosts. *Journal of medical entomology*. 2001;38(2):289-297.

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

Lundström JO, Schäfer ML, Hesson JC, Blomgren E, Lindström A, Wahlqvist P, Persson Vinnersten TZ. The geographic distribution of mosquito species in Sweden. *Journal of the European Mosquito Control Association.* 2013;31:21–35.

Lundström JO, Hesson JC, Schäfer ML, Östman Ö, Semmler T, Bekaert M, et al. Sindbis virus polyarthritis outbreak signalled by virus prevalence in the mosquito vectors. *PLoS neglected tropical diseases,* 2019;13(8):e0007702.

Lvov DK, Vladimirtseva EA, Butenko AM, Karabatsos N, Trent DW, Calisher CH. Identity of Karelian fever and Ockelbo viruses determined by serum dilution-plaque reduction neutralization tests and oligonucleotide mapping. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 1988;39(6):607-610.

Maier WA, Grunewald J, Habedank B, Harteh K, Kampen H, Kimmig P, et al. Mögliche Auswirkungen von Klimaveränderung auf die Ausbreitung von primär humanmedizinisch relevanten Krankheitserregern über tierische Vektoren sowie auf die wichtigen Humanparasiten in Deutschland. *Climate Change.* 2003;5(03).

Malherbe AL. Sindbis virus infection in man-report of a case with recovery of virus from skin lesions. *South African Medical Journal.* 1963;37(21):547-552.

Manni T, Kurkela S, Vaheri A, Vapalahti O. Diagnostics of Pogosta disease: antigenic properties and evaluation of Sindbis virus IgM and IgG enzyme immunoassays. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 2008;8(3):303-312.

Medlock JM, Hansford KM, Versteirt V, Cull B, Kampen H, Fontenille D, et al. An entomological review of invasive mosquitoes in Europe. *Bulletin of entomological research.* 2015;105(6):637-663.

Mukhopadhyay S, Zhang W, Gabler S, Chipman PR, Strauss EG, Strauss JH, et al. Mapping the structure and function of the E1 and E2 glycoproteins in alphaviruses. *Structure*. 2006;14(1):63-73.

Muturi EJ, Bara J. Sindbis virus interferes with dengue 4 virus replication and its potential transmission by *Aedes albopictus*. *Parasites & vectors*. 2015;8(1):65.

Müller W. Die Distanz-und Kontakt-Orientierung der Stechmücken (*Aedes aegypti*) (Wirtsfindung, Stechverhalten und Blutmahlzeit). *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. 1968;58(3):241-303.

Norder H, Lundström JO, Kozuch O, Magnius LO. Genetic relatedness of Sindbis virus strains from Europe, Middle East, and Africa. *Virology*. 1996;222(2):440-445.

Niklasson B, Espmark A, LeDuc JW, Gargan TP, Ennis WA, Tesh RB, Main Jr AJ. Association of a Sindbis-like virus with Ockelbo disease in Sweden. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1984;33(6):1212-1217.

Olivieri EHR, de Andrade Franco L, Pereira RG, Carvalho Mota LD, Campos AHJ, Carraro DM. Biobanking practice: RNA storage at low concentration affects integrity. *Biopreservation and biobanking*. 2014;12(1):46-52.

Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes and Infection*. 2009;11(14-15):1177-1185.

Peng Z, Simons FR. A prospective study of naturally acquired sensitization and subsequent desensitization to mosquito bites and concurrent antibody responses. *Journal of allergy and clinical immunology*. 1998;101(2):284-286.

Peng Z, Beckett AN, Engler RJ, Hoffman DR, Ott NL, Simons FER. Immune responses to mosquito saliva in 14 individuals with acute systemic allergic reactions to mosquito bites. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004;114(5):1189-1194.

Rayner JO, Dryga SA, Kamrud KI. Alphavirus vectors and vaccination. *Reviews in medical virology*. 2002;12(5):279-296.

Roessler HP. Versuche zur geruchlichen Anlockung weiblicher Stechmücken (*Aedes aegypti* L., Culicidae). *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. 1961;44(2):184-231.

Rupp JC, Sokoloski KJ, Gebhart NN, Hardy RW. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *Journal of General Virology*. 2015;96(9):2483-2500.

Sane J, Guedes S, Ollgren J, Kurkela S, Klemets P, Vapalahti O, et al. Epidemic sindbis virus infection in Finland: a population-based case-control study of risk factors. *Journal of Infectious Diseases*. 2011;204(3):459-466. [Sane et al. 2012a]

Sane J, Kurkela S, Levanov L, Nikkari S, Vaheri A, Vapalahti O. Development and evaluation of a real-time RT-PCR assay for Sindbis virus detection. *Journal of virological methods*. 2012;179(1):185-188. [Sane et al. 2012b]

Sane J, Kurkela S, Putkuri N, Huhtamo E, Vaheri A, Vapalahti O. Complete coding sequence and molecular epidemiological analysis of Sindbis virus isolates from mosquitoes and humans, Finland. *Journal of General Virology*. 2012;93(9):1984-1990. [Sane et al. 2012c]

Sane J, Kurkela S, Desdouits M, Kalimo H, Mazalrey S, Lokki ML, et al. Prolonged myalgia in Sindbis virus infection: case description and in vitro infection of myotubes and myoblasts. *The Journal of infectious diseases*. 2012;206(3):407-414.

Schaffner F, Vazeille M, Kaufmann C, Failloux AB, Mathis A. Vector competence of *Aedes japonicus* for chikungunya and dengue viruses. *Journal of the European Mosquito Control Association*. 2011;29:141-142.

Schäfer M. Mosquitoes as a part of Wetland Biodiversity. [Ph.D.] Uppsala: Acta Universitatis Uppsala; 2004

Schäfer ML, Lundström JO, Pfeffer M, Lundkvist E, Landin J. Biological diversity versus risk for mosquito nuisance and disease transmission in constructed wetlands in southern Sweden. *Medical and veterinary entomology*. 2004;18(3):256-267.

Schäfer ML, Lundström JO, Petersson E. Comparison of mosquito (Diptera: Culicidae) populations by wetland type and year in the lower River Dalälven region, Central Sweden. *Journal of Vector Ecology*. 2008;33(1):150-157.

Scheuch D, Schäfer M, Eiden M, Heym E, Ziegler U, Walther D, et al. Detection of Usutu, Sindbis, and Batai viruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in Germany, 2011–2016. *Viruses*. 2018;10(7):389.

Schneider BS, Higgs S. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008;102(5):400-408.

Shope RE. The discovery of arbovirus diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1994;740(1):138-145.

Skogh M, Espmark A. Ockelbo disease: epidemic arthritis-exanthema syndrome in Sweden caused by Sindbis-virus like agent. *Lancet*. 1982;1:795–796.

Storm N, Weyer J, Markotter W, Kemp A, Leman PA, Dermaux-Msimang V, Paweska JT. Human cases of Sindbis fever in South Africa, 2006–2010. *Epidemiology & Infection*. 2014;142(2):234-238.

Strauss EG, Rice CM, Strauss JH. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of Sindbis virus. *Virology*. 1984;133(1):92-110.

Strauss JH. *Molecular Studies of Alphavirus Immunogenicity*. Final Report; prepared for U.S. ARMY Medical Research And Development Fort Detrick, Frederick, Maryland 21702-5012. California Institute Of Technology, Pasadena; 1992

Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological reviews*. 1994;58(3):491-562.

Suhrbier A, Jaffar-Bandjee MC, Gasque P. Arthritogenic alphaviruses—an overview. *Nature Reviews Rheumatology*. 2012;8(7):420-429.

Takken W. The role of olfaction in host-seeking of mosquitoes: a review. *International Journal of Tropical Insect Science*. 1991;12(1-2-3):287-295.

Taylor RM, Hurlbut HS, Work TH, Kingston JR, Frothingham TE. Sindbis Virus: A Newly Recognized Arthropod-Transmitted Virus¹. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1955;4(5):844-862.

Tesh RB. Arthritides caused by mosquito-borne viruses. *Annual review of medicine*. 1982;33(1):31-40.

Turunen, M, Kuusisto P, Uggeldahl PE, Toivanen A. Pogosta disease: clinical observations during an outbreak in the province of North Karelia, Finland. *British journal of Rheumatology*. 1998;37(11):1177-1180.

Walther D, Scheuch DE, Kampen H. The invasive Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Germany: Local reproduction and overwintering. *Acta tropica*. 2017;166:186-192.

Weaver SC, Frey TK, Huang HV, Kinney RM, et al. *Togaviridae*. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV*. London, UK: Elsevier/Academic Press. 2005;999–1008.

Whitfield D, Curtis CF, White GB, Targett GA, Warhurst DC, Bradley DJ. Two cases of falciparum malaria acquired in Britain. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984;289(6458):1607-1609.

Wojta J, Aspöck H. Untersuchungen über die Möglichkeit der Einschleppung durch Stechmücken übertragener Arboviren durch Vögel nach Mitteleuropa. BFB-Bericht. 1982;43:165-172.

Zhang W, Mukhopadhyay S, Pletnev SV, Baker TS, Kuhn RJ, Rossmann MG. Placement of the structural proteins in Sindbis virus. Journal of Virology. 2002;76(22):11645-11658.

Zielke DE, Walther D, Kampen H. Newly discovered population of *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Upper Bavaria, Germany, and Salzburg, Austria, is closely related to the Austrian/Slovenian bush mosquito population. Parasites & vectors. 2016;9(1):163.

9 Danksagung

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

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Martin Pfeffer für die Möglichkeit als Studentin meine Projektarbeit unter seiner Betreuung abzuleisten und im Anschluss an das Studium in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Danke für deine Unterstützung!

Dr. Anna Obiegala möchte ich für das viele Korrigieren, Motivieren, die Hilfestellungen und die schöne Zeit zusammen im Büro danken.

Besonderer Dank geht an Dr. Stephanie Speck für den Unterricht in Sachen Zellkultur, die vielen guten Ratschläge und die Einsatzbereitschaft für mein Vorankommen, trotz der Tatsache, dass ich nicht zur gleichen Arbeitsgruppe gehört habe.

Für Hilfe im Labor und die schöne Zeit im Institut bedanke ich mich sehr bei Dana Rüster und den Mitdoktoranden Daniel Galfsky, Maria Krügel, Ewgenii Karliuk, Lisa Eisenlöffel, Tina Rocktäschel, Lisa Nau und Enrico Baßler.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Jil Waade und Sophia Körner mit denen ich das gesamte Studium zusammen durchgestanden habe und deren Freundschaft schon unter die Haut geht, sowie bei Rebecca Großmann mit der das Studium ab der Klinik deutlich bunter wurde.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, gilt natürlich meine Dankbarkeit für die seelische und auch finanzielle Unterstützung.

Auch habe ich mich bei Caipi, Fjara und Kiwi für entgegengebrachte Wärme während des Großteils meiner Schreibarbeiten zu bedanken, aus der immer wieder neue Motivation entstand.

Last, but surely not least will ich meinem Sebastian für all die aufbauenden Worte und die Geduld, die er mir schon zum Physikum, dem Staatsexamen und jetzt auch während der Promotion entgegengebracht hat danken. Wyrð bið ful aræd und ohne dich hätte ich das nicht geschafft.