

UMWELT UND GESUNDHEIT

05/2023

**Abschlussbericht**

# Vektorpotential einheimischer Stechmücken

**von:**

Anna Heitmann, Stephanie Jansen, Renke Lühken, Jonas Schmidt-Chanasit, Esther Schnettler,  
Egbert Tannich  
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg

**Herausgeber:**  
Umweltbundesamt



UMWELT UND GESUNDHEIT 05/2023

Ressortforschungsplan des Bundesministeriums für  
Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit

Forschungskennzahl 3717 484 32 0  
FB000995

Abschlussbericht

# **Vektorpotential einheimischer Stechmücken**

von

Anna Heitmann, Stephanie Jansen, Renke Lühken, Jonas  
Schmidt-Chanasit, Esther Schnettler, Egbert Tannich  
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

## Impressum

### Herausgeber

Umweltbundesamt  
Wörlitzer Platz 1  
06844 Dessau-Roßlau  
Tel: +49 340-2103-0  
Fax: +49 340-2103-2285  
[buergerservice@uba.de](mailto:buergerservice@uba.de)  
Internet: [www.umweltbundesamt.de](http://www.umweltbundesamt.de)

[f/umweltbundesamt.de](https://www.facebook.com/umweltbundesamt.de)

[t/umweltbundesamt](https://twitter.com/umweltbundesamt)

### Durchführung der Studie:

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin  
Bernhard-Nocht-Strasse 74  
20359 Hamburg

### Abschlussdatum:

Juni 2022

### Redaktion:

Fachgebiet IV 1.4 Gesundheitsschädlinge und ihre Bekämpfung  
Carola Kuhn

Publikationen als pdf:

<http://www.umweltbundesamt.de/publikationen>

ISSN 1868-4340

Dessau-Roßlau, Oktober 2023

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.

### **Danksagung**

Besonderer Dank gilt den Kolleg\*innen der Abteilung Arbovirologie und Molekularer Entomologie des BNITM, die an der technischen Umsetzung der Experimente beteiligt waren: Michelle Helms, Jonny Schulze, Christina Scherer, Marlis Badusche, Bernhard Zibrat und Mine Altinli. Zusätzlich möchten wir uns bei der NGS facility unter der Leitung von Daniel Cadar am BNITM bedanken, welche die „adaptierten“ Viren sequenziert hat. Außerdem danken wir den Kolleg\*innen, die im Feld Stechmücken für die Versuche gefangen und zur Verfügung gestellt haben, insbesondere Norbert Becker (Institut für Dipterologie), Hanna Jöst (AG Arbovirologie) und Sandra Oerther (Institut für Dipterologie). Zudem möchten wir uns bei Carola Kuhn (UBA) für die hervorragende Fachaufsicht und die konstruktiven wissenschaftlichen Diskussionen bedanken.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch EVAg (European Virus Archive goes global), welches seine Finanzierung durch das Horizon 2020 Programm der Europäischen Union unter der Nummer 653316 erhalten hat.

### **Acknowledgements**

Special thanks go to the colleagues from the Department of Arbovirology and Molecular Entomology involved in the laboratory work: Michelle Helms, Jonny Schulze, Christina Scherer, Marlis Badusche, Bernhard Zibrat und Mine Altinli. Thanks goes as well to the NGS facility lead by Daniel Cadar at the BNITM for sequencing the “adapted” virus strains. We would also like to thank the colleagues responsible for providing mosquitoes from the field especially Norbert Becker (Institute for Dipterology), Hanna Jöst (Department of Arbovirology) und Sandra Oerther (Institute for Dipterology). Special thanks go to Carola Kuhn for excellent scientific supervision (UBA) and helpful discussions.

This publication was supported by the European Virus Archive goes Global (EVAg) project, which has received funding from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 653316.

### **Kurzbeschreibung: Vektorpotential einheimischer Stechmücken**

In den letzten Jahren haben sich klinisch relevante Arboviren geographisch ausgebreitet. Im Rahmen des Projektes „Vektorpotential einheimischer Stechmücken“ wurden Daten erhoben, um für Deutschland eine räumliche Risikoanalyse in Abhängigkeit von Temperatur, Stechmückenverbreitung und der Populationsdichte des Menschen für relevante tropische Arboviren durchzuführen (Dengue-, Chikungunya- und Zika-Virus). Im Forschungsbericht werden die im Labor erhobenen Daten zur Vektorkompetenz einheimischer und exotischer Stechmückenarten sowie die Adaptionsfähigkeit von Viren an niedrigere Temperaturen in Zellkultur dargestellt.

Das Vektorpotential der Stechmückenspezies ist dabei sehr unterschiedlich bezüglich der untersuchten Temperaturen sowie der verschiedenen Viren. Übergreifend ergibt sich, dass die Verbreitung von exotischen Arten wie *Aedes albopictus* mit hohem Vektorpotential verbunden ist, aber auch einheimische Arten (*Aedes sticticus*, *Culex torrentium*) beobachtet werden müssen, um auf mögliche Eintragungen neuer Arboviren vorbereitet zu sein.

### **Abstract: Vector potential of native mosquitoes**

In recent years, clinically relevant arboviruses have spread. As part of the project "Vektorpotential einheimischer Stechmücken", data was collected in order to carry out a spatial risk analysis depending on temperature, mosquito distribution and human population density for relevant tropical arboviruses (dengue virus, chikungunya virus and Zika virus). The research report presents the data collected in the laboratory on the vector competence of native and exotic mosquito species as well as the ability of viruses to adapt to lower temperatures in cell culture.

The vector potential of the mosquito species is very specific to the investigated temperatures as well as viruses. Overall, it can be seen that the spread of exotic species such as *Aedes albopictus* carries a high vector potential, but also native species (*Aedes sticticus*, *Culex torrentium*) must be observed in order to be prepared for possible entries of new arboviruses.

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	9
Tabellenverzeichnis.....	10
Abkürzungsverzeichnis.....	11
Zusammenfassung .....	12
Summary .....	14
1 Einleitung.....	16
1.1 Stechmücken als Überträger von Viren.....	16
1.2 Arboviren in Deutschland und Zentraleuropa.....	16
1.3 Adaptationsfähigkeit von Arboviren.....	17
1.4 Notwendigkeit des Forschungsvorhabens.....	17
1.5 Forschungsziele.....	18
2 Verwendete Virusstämme .....	19
2.1 Auswahl der Virusstämme .....	19
2.2 Anzucht der Viren .....	19
2.2.1 CHIKV .....	19
2.2.2 ZIKV.....	19
2.2.3 DENV.....	19
2.2.4 WNV.....	20
3 Stechmückenspezies .....	21
3.1 Auswahl der zu untersuchenden Stechmücken und Fangorte.....	21
4 Laboruntersuchungen zum Vektorpotential einheimischer Stechmücken .....	22
4.1 Stechmücken der Gattung <i>Culex</i> .....	23
4.1.1 <i>Culex torrentium</i> .....	23
4.1.1.1 CHIKV.....	23
4.1.1.2 ZIKV.....	24
4.1.2 <i>Culex pipiens</i> biotype <i>pipiens</i> .....	24
4.1.2.1 CHIKV.....	24
4.1.2.2 ZIKV.....	25
4.2 Exotische Stechmücken der Gattung <i>Aedes</i> .....	25
4.2.1 <i>Aedes aegypti</i> .....	25
4.2.2 <i>Aedes albopictus</i> .....	25
4.2.2.1 CHIKV.....	25
4.2.2.2 ZIKV.....	27

4.3	Einheimische <i>Aedes</i> -Arten .....	28
4.3.1	<i>Aedes vexans</i> .....	28
4.3.1.1	CHIKV .....	28
4.3.1.2	ZIKV .....	29
4.3.1.3	WNV .....	29
4.3.2	<i>Aedes sticticus</i> .....	29
4.3.2.1	CHIKV .....	29
4.3.2.2	WNV .....	30
4.3.3	<i>Aedes detritus</i> .....	30
4.3.3.1	ZIKV .....	30
4.3.3.2	WNV .....	31
5	Laboruntersuchungen zur Adaptionfähigkeit.....	32
5.1	Anpassungen an niedrige Temperaturen .....	32
5.2	Charakterisierung der Mutationen mittels NGS .....	33
5.2.1	DENV .....	33
5.2.2	ZIKV .....	33
5.2.3	WNV .....	34
5.3	Infektiosität in Säugetierzellen .....	35
5.4	Wachstum der „adaptierten“ Viren in Zellkultur bei unterschiedlichen Temperaturen .....	36
5.4.1	ZIKV .....	37
5.4.2	WNV .....	38
5.5	Vektorkompetenz der Stechmücken für „adaptierte“ Viren.....	38
5.5.1	ZIKV .....	38
5.5.2	WNV .....	39
6	Erststellung von deutschlandweiten Risikokarten für die Übertragung der ausgewählten Viren	40
6.1	Karten der Temperaturbedingungen und Vektorverbreitung.....	40
6.2	Risikokarten für das Virusübertragungsrisiko.....	44
6.3	Finale Risikokarten.....	46
7	Quellenverzeichnis.....	50

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der experimentellen Anpassung von DENV, ZIKV und WNV an niedrige Temperaturen. ....	33
Abbildung 2: Sequenzierung und Mutationsanalyse der „adaptierten“ DENV-1, ZIKV und WNV Viren. ....	34
Abbildung 3: Wachstumskurven von „temperaturangepassten“ ZIKV und WNV in Säugetierzellen. ....	36
Abbildung 4: Wachstumskurven von „adaptierten“ ZIKV in Stechmückenzellen. .	37
Abbildung 5: Wachstumskurven von „adaptierten“ WNV in Stechmückenzellen. 38	
Abbildung 6: Mittlere Anzahl der Tage pro Jahr mit einer mittleren Tagestemperatur von 18°C, 21°C, 24°C bzw. 27°C nach 14 aufeinander folgenden Tagen der jeweiligen Temperatur (= Inkubationszeit in Stechmücke) (Zeitraum 1999-2019).....	41
Abbildung 7: Mittlere Anzahl der Tage pro Jahr mit einer mittleren Tagestemperatur von 18°C, 21°C 24°C bzw. 27°C nach 14 aufeinander folgenden Tagen der jeweiligen Temperatur (= Inkubationszeit in Stechmücke) (Zukunfts-Szenario für 2100 mit +2,6°C). ....	42
Abbildung 8: Potenzielles Verbreitungsgebiet von <i>Aedes albopictus</i> in Deutschland.....	43
Abbildung 9: Potenzielles Verbreitungsgebiet von <i>Aedes sticticus</i> und <i>Aedes detritus</i> in Deutschland. ....	44
Abbildung 10: Risikomatrix unter Berücksichtigung des Transmissionsrisikos und der Vektorverbreitung. ....	45
Abbildung 11: Risikokarten für das aktuelle und zukünftige Transmissionsrisiko von CHIKV in Deutschland auf Grundlage der Risikomatrix in Abbildung 10. ....	45
Abbildung 12: Risikokarten für das aktuelle und zukünftige Transmissionsrisiko von ZIKV in Deutschland auf Grundlage der Risikomatrix in Abbildung 10. ....	46
Abbildung 13: Bevölkerungsdichtekarte.....	47
Abbildung 14: Risikomatrix der finalen Risikokarten unter Berücksichtigung des Transmissionsrisikos und der Bevölkerungsdichte. ....	47
Abbildung 15: Finale Risikokarten für das aktuelle Übertragungsrisiko von CHIKV in Deutschland auf Grundlage des Transmissionsrisikos (Abbildung 11) und der Bevölkerungsdichte (Abbildung 13)...	48
Abbildung 16: Finale Risikokarten für das zukünftige Übertragungsrisiko von ZIKV in Deutschland auf Grundlage des Transmissionsrisikos (Abbildung 12) und der Bevölkerungsdichte (Abbildung 13)...	48

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Virusstämme.....	19
Tabelle 2: Fangorte der Stechmückenspezies.....	21
Tabelle 3: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Chikungunya Virus in <i>Culex torrentium</i> aus Norddeutschland.....	23
Tabelle 4: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Chikungunya Virus in <i>Culex torrentium</i> aus Süddeutschland.....	24
Tabelle 5: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Chikungunya Virus in <i>Culex pipiens</i> aus Norddeutschland.....	24
Tabelle 6: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Chikungunya Virus in <i>Aedes albopictus</i> aus Deutschland .....	25
Tabelle 7: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Chikungunya Virus in <i>Aedes albopictus</i> aus Italien .....	25
Tabelle 8: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Chikungunya Virus in <i>Aedes albopictus</i> aus Deutschland .....	27
Tabelle 9: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Zika Virus in <i>Aedes albopictus</i> aus Deutschland .....	27
Tabelle 10: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Zika Virus in <i>Aedes albopictus</i> aus Italien.....	28
Tabelle 11: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Chikungunya Virus in <i>Aedes vexans</i> .....	28
Tabelle 12: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Zika Virus in <i>Aedes vexans</i> .....	29
Tabelle 13: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für West-Nil-Virus in <i>Aedes vexans</i> .....	29
Tabelle 14: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Chikungunya Virus in <i>Aedes sticticus</i> .....	30
Tabelle 15: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für West-Nil-Virus in <i>Aedes sticticus</i> .....	30
Tabelle 16: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Zika Virus in <i>Aedes detritus</i> .....	31
Tabelle 17: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für West-Nil-Virus in <i>Aedes detritus</i> .....	31
Tabelle 18: Genutzte Zelllinien .....	32

## Abkürzungsverzeichnis

<b>A549/BVDV-Npro</b>	Immunsupprimierte Zelllinie aus <i>Homo sapiens</i>
<b>Aag2-AF319</b>	Immunsupprimierte Zelllinie aus <i>Aedes aegypti</i>
<b>Ae.</b>	<i>Aedes</i>
<b>Arboviren</b>	Arthropode borne viruses
<b>C6/36</b>	Immunsupprimierte Zelllinie aus <i>Aedes albopictus</i>
<b>CHIKV</b>	Chikungunya Virus
<b>CPE</b>	cytopathic effect
<b>Ct</b>	Zelllinie aus <i>Culex tarsalis</i>
<b>Cx.</b>	<i>Culex</i>
<b>DENV</b>	Dengue Virus
<b>dpi</b>	Days post infection
<b>EVAg</b>	European virus archive goes global
<b>IR</b>	Infektionsrate
<b>ml</b>	Milliliter
<b>NGS</b>	next generation sequencing
<b>P</b>	Passage
<b>PFU</b>	plaque forming unit
<b>RNA</b>	ribonucleic acid
<b>TCID50</b>	Tissue culture infection dose 50
<b>TE</b>	Transmissionseffizienz
<b>TR</b>	Transmissionsrate
<b>U4.4</b>	Zelllinie aus <i>Aedes albopictus</i>
<b>USUV</b>	Usutu Virus
<b>Vero ATTC</b>	„ <i>Verda reno</i> “ – green kidney <i>Chlorocabus sp.</i> ; Zelllinie aus Nierenzellen der Afrikanischen Grünen Meerkatze
<b>WNV</b>	West-Nil-Virus
<b>ZIKV</b>	Zika Virus

## Zusammenfassung

In dem Projekt „Vektorpotenzial einheimischer Stechmücken“ wurde vor dem Hintergrund der Klimaerwärmung der Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf das Vektorpotenzial ausgewählter einheimischer Stechmückenarten für drei tropische Arboviren (arthropod-borne viruses) analysiert: Chikungunya Virus (CHIKV), Dengue Virus (DENV) und das Zika Virus (ZIKV). Ergänzende Studien wurden teilweise auch mit dem West-Nil-Virus (WNV) durchgeführt. Die Untersuchungen wurden mit folgenden Stechmückenarten durchgeführt: *Aedes albopictus*, *Ae. vexans*, *Ae. sticticus*, *Ae. detritus* sowie *Culex torrentium* und *Cx. pipiens*. Das Projekt umfasste dabei drei Projektteile: 1) die Erhebung der Vektorkompetenz von unterschiedlichen einheimischen Stechmücken für die Arboviren bei unterschiedlichen Temperaturen, 2) Adaptionsfähigkeit der tropischen Arboviren an niedrigere Temperaturbedingungen und 3) eine Zusammenführung der in den Experimenten erhobenen Daten für eine räumliche Risikoanalyse in Abhängigkeit von Temperatur, Stechmückenverbreitung und der Populationsdichte des Menschen. Die Laboruntersuchungen zur temperaturabhängigen Vektorkompetenz von in Deutschland einheimischen Stechmücken wurden bei mindestens vier unterschiedlichen Temperaturen ( $18\pm 5^\circ\text{C}$ ,  $21\pm 5^\circ\text{C}$ ,  $24\pm 5^\circ\text{C}$  und  $27\pm 5^\circ\text{C}$ ) durchgeführt, welche sowohl den aktuellen Temperaturbereich in Zentraleuropa als auch den der zukünftig erwartbaren Temperaturen im Zuge der Klimaerwärmung abdecken. In den Experimenten wurden jeweils die Infektionsraten, Transmissionsraten und Transmissionseffizienzen erhoben. Vektorkompetenzversuche für DENV konnten in diesem Projekt nicht erfolgreich etabliert werden.

Für CHIKV konnte in *Cx. torrentium* bei  $21\pm 5^\circ\text{C}$  bis  $27^\circ\text{C}\pm 5^\circ\text{C}$  eine mittlere Transmissionseffizienz (TE) nachgewiesen werden (3-25%). Dagegen zeigte *Cx. pipiens* nur bei  $27^\circ\text{C}\pm 5^\circ\text{C}$  eine niedrige TE von 3,5%. Beide *Culex*-Arten konnten keine Vektorkompetenz für ZIKV auf.

Die exotische, mittlerweile in Teilen Deutschlands etablierte Stechmückenart *Ae. albopictus* ist ein kompetenter Vektor für CHIKV und ZIKV. Für CHIKV konnte eine sehr hohe TE (bis zu 60%) nachgewiesen werden, die bei niedrigeren Temperaturen höher lag als bei den untersuchten höheren Temperaturen. In den Experimenten mit ZIKV konnte nur bei hohen Temperaturen ( $27^\circ\text{C}$ ) eine Transmission (TE 17,6%) beobachtet werden, jedoch nicht bei  $18^\circ\text{C}$ .

Die Überflutungsart *Ae. vexans* zeigte bei  $21^\circ\pm 5^\circ\text{C}$  eine niedrige TE von 7% für CHIKV auf. Für ZIKV und WNV konnte keine Vektorkompetenz nachgewiesen werden. Die zweite Überflutungsstechmücke *Ae. sticticus* zeigte ebenfalls keine Vektorkompetenz für WNV auf, aber für CHIKV konnte eine höhere TE (33,3%) bei  $24\pm 5^\circ\text{C}$  nachgewiesen werden. Abschließend konnte für die Küstenart *Ae. detritus* eine hohe TE (bis zu 30,3%) für ZIKV, aber keine Vektorkompetenz für WNV nachgewiesen werden.

In Zellkulturversuchen wurde getestet, inwieweit sich Arboviren in Stechmückenzellen an niedrigere Temperaturen anpassen können. Dabei sollten die Arboviren über 10 Wochen bei niedrigen Temperaturen ( $18\pm 5^\circ\text{C}$ ,  $21\pm 5^\circ\text{C}$ ,  $24\pm 5^\circ\text{C}$ ) passagiert werden. Durch eine Analyse der Replikationsfähigkeit, der Anzahl/Position der Virusmutationen und des Wachstums in Säugetierzellen sollte untersucht werden, ob eine Adaption nach 10-wöchigem Passagieren stattgefunden hat und ggf. eine Übertragung bei niedrigeren Temperaturen erlauben würde. Da sich in den Vektorkompetenzstudien zeigte, dass CHIKV auch schon bei  $15\pm 5^\circ\text{C}$  in der Stechmücke repliziert, waren weitere Adaptionsversuche an tiefere Temperaturen obsolet. Die Adaptionsversuche in Zellkultur wurden deshalb nur für DENV-1, DENV-2, ZIKV und WNV durchgeführt. DENV-1, DENV-2, ZIKV und WNV konnten nicht erfolgreich über 10 Wochen bei  $18\pm 5^\circ\text{C}$  passagiert werden. Jedoch konnte für ZIKV, DENV-1 und WNV infektiöser Überstand

nach 10 Passagen bei sowohl  $21\pm 5^{\circ}\text{C}$  als auch  $24\pm 5^{\circ}\text{C}$  hergestellt werden. Für ZIKV konnte keine Anpassung an niedrigere Temperaturen festgestellt werden. Für DENV-1 wurden Mutationen identifiziert, welche nur in den temperaturangepassten Viren zu finden waren und dadurch eine mögliche Anpassung an niedrigere Temperaturen darstellten. Da sich eine Durchführung von Vektorkompetenzstudien mit DENV als technisch nicht realisierbar dargestellt hatte, wurde auf die Durchführung weiterer Zellkulturversuche verzichtet. Für WNV konnte zwar eine Vielzahl unterschiedlicher Mutationen bei den „adaptierten“ Viren festgestellt werden, die sich jedoch als eine Anpassung an die Stechmückenzellen und nicht an die tieferen Temperaturen herausstellten.

Die untersuchten einheimischen *Culex*- und *Aedes*-Arten hatten keine Vektorkompetenz für ZIKV. Einzige Ausnahme bildet die ausschließlich in Küstengebieten verbreitete *Ae. detritus*. Die exotische Spezies *Ae. albopictus* zeigte ebenfalls eine Vektorkompetenz für ZIKV auf, allerdings ausschließlich bei einer höheren Temperatur von  $27^{\circ}\text{C}$ . Dies stellt sich für CHIKV anders dar. Für dieses Virus konnte eine hohe Vektorkompetenz von *Ae. albopictus* auch bei niedrigeren Temperaturen bis zu  $15^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$  (TE 32,5%) festgestellt werden. Eine niedrigere Vektorkompetenz wurde für einheimische *Culex*-Arten und *Aedes*-Arten nachgewiesen. Dabei hatte besonders *Ae. sticticus* bei  $24^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$  eine relativ hohe TE. Durch die starke Temperaturabhängigkeit von ZIKV in *Ae. albopictus* und der sehr lokalen Verbreitung von *Ae. sticticus* in Überflutungsgebieten besteht für die Übertragung von ZIKV deutschlandweit aktuell ein sehr geringes Risiko. Im Gegensatz dazu besteht ein erhöhtes Risiko für die Zirkulation von CHIKV: die Kombination von Temperatur, Verbreitung des Vektors und Bevölkerungsdichte führt zu einem erhöhten Risiko in Nordrhein-Westfalen, dem Oberrheingebiet und dem zentralen Ostdeutschland. Mit steigender Temperatur muss langfristig mit der weiteren Ausbreitung der vektorkompetenten Art *Ae. albopictus* und damit mit einem steigenden Risiko der lokalen CHIKV-Übertragung in Deutschland gerechnet werden. Das relativ hohe Vektorpotential für CHIKV von *Cx. torrentium* und *Ae. sticticus* unterstreicht, dass auch einheimische Stechmückenspezies eingeschleppte Arboviren übertragen können, was bei zukünftigen Risikobewertungen berücksichtigt werden sollte.

## Summary

In the project "Vektorpotenzial einheimischer Stechmücken", the influence of climate warming on the vector potential of selected native mosquito species was analyzed for three tropical arthropod-borne viruses: chikungunya virus (CHIKV), dengue virus (DENV), and Zika virus (ZIKV). Additional studies were also conducted with West Nile virus (WNV). Studies were conducted with following mosquito species: *Aedes albopictus*, *Ae. vexans*, *Ae. sticticus*, *Ae. detritus* sowie *Culex torrentium* und *Cx. pipiens*. The project comprised three project parts: 1) the survey of vector competence of different native mosquitoes for the arboviruses at different temperatures, 2) adaptive capacity of tropical arboviruses to lower temperature conditions, and 3) merging of the data collected in the experiments for a spatial risk analysis in relation to temperature, mosquito distribution, and human population density. Laboratory studies of temperature-dependent vector competence of mosquitoes native to Germany were conducted, covering at least four different temperatures ( $18\pm 5^\circ\text{C}$ ,  $21\pm 5^\circ\text{C}$ ,  $24\pm 5^\circ\text{C}$ , and  $27\pm 5^\circ\text{C}$ ), i.e., the current temperature range in central Europe and temperatures that can be expected in the future in the course of climate warming. In each of the experiments, infection rates, transmission rates, and transmission efficiencies were determined. Vector competence experiments for DENV could not be successfully established in this project.

For *Cx. torrentium*, medium transmission efficiency (TE) for CHIKV was demonstrated at  $21\pm 5^\circ\text{C}$  to  $27^\circ\text{C}\pm 5^\circ\text{C}$  (3-25%). In contrast, *Cx. pipiens* showed a low TE of 3.5% only at  $27^\circ\text{C}\pm 5^\circ\text{C}$ . No vector competence for ZIKV was detected for either *Culex* species.

The exotic mosquito species *Ae. albopictus*, which is established in parts of Germany, is a competent vector for CHIKV and ZIKV. For CHIKV, a very high TE (up to 60%) was detected for the species, which was higher at lower temperatures than at the studied high temperatures. In the experiments with ZIKV, transmission (TE 17,6%) was observed for *Ae. albopictus* only for high temperatures ( $27^\circ\text{C}$ ), but not at  $18^\circ\text{C}$ .

The flood-water species *Ae. vexans* showed a low TE for CHIKV of 7% at  $21^\circ\pm 5^\circ\text{C}$ . No vector competence was demonstrated for ZIKV and WNV for *Ae. vexans*. The second flood-water mosquito *Ae. sticticus* also showed no vector competence for WNV, but a higher TE for CHIKV (33,3%) at  $24\pm 5^\circ\text{C}$ . Finally, the coastal species *Ae. detritus* showed high TE (up to 30%) for ZIKV but no vector competence for WNV.

Cell culture experiments were conducted to test the ability of the three arboviruses to adapt to lower temperatures in mosquito cells. Additional studies were conducted with WNV. Here, the arboviruses were to be passaged at low temperatures ( $18\pm 5^\circ\text{C}$ ,  $21\pm 5^\circ\text{C}$ ,  $24\pm 5^\circ\text{C}$ ) for 10 weeks. Analysis of replication capacity, number/position of viral mutations, and growth in mammalian cells was investigated to determine whether adaptation had occurred after 10 weeks of passage and, if so, would allow transmission at lower temperatures. Since our vector competence studies showed that CHIKV also replicates in mosquitoes at  $15\pm 5^\circ\text{C}$ , further adaptation experiments to lower temperatures were not conducted. Therefore, the adaptation experiments in cell culture were performed only with DENV-1, DENV-2, ZIKV and WNV. DENV-1, DENV-2, ZIKV and WNV could not be successfully passaged at  $18\pm 5^\circ\text{C}$  for 10 weeks. However, ZIKV, DENV-1, and WNV infectious supernatant could be produced after 10 passages at both,  $21\pm 5^\circ\text{C}$  and  $24\pm 5^\circ\text{C}$ . For ZIKV, no adaptation to lower temperatures was detected. For DENV-1, mutations were identified that were only found in the temperature-adapted viruses, thus representing a possible adaptation to lower temperatures. Since conducting vector competence studies with DENV proved to be technically infeasible, further cell culture experiments were not conducted. For WNV, although a variety of different mutations were detected in the "temperature-adapted"

viruses, these were found to be an adaptation to mosquito cells rather than to lower temperatures.

The native *Culex* and *Aedes* species examined had no vector competence for ZIKV. The only exception is *Ae. detritus*, which is exclusively distributed to coastal areas. *Aedes albopictus*, on the other hand, showed vector competence, but exclusively at tropical temperatures. This is different for CHIKV. For this virus, high vector competence was found for *Ae. albopictus* even at lower temperatures down to  $15\pm 5^{\circ}\text{C}$ , and lower vector competence was also detected for native *Culex* and *Aedes* species. In this context, especially *Ae. sticticus* had a relatively high TE at  $24\pm 5^{\circ}\text{C}$ . Due to the requirements for high temperature for ZIKV transmission in *Ae. albopictus* and the locally restricted distribution of *Ae. sticticus* in floodplains, there is currently a very low risk for ZIKV transmission throughout Germany. In contrast, there is a high potential risk for the circulation of CHIKV: the combination of temperature, distribution of the vector and population density lead to an increased risk in North Rhine-Westphalia, the Upper Rhine area and central eastern Germany. With increasing temperature, an increasing risk of local CHIKV transmission in Germany must be expected in the long-term with the further spread of the vector-competent species *Ae. albopictus*. The observed relatively high TE by *Cx. torrentium* and *Ae. sticticus* underlines the need to keep our native species in mind for risk analysis of transmission of newly introduced arboviruses in Germany.

# 1 Einleitung

## 1.1 Stechmücken als Überträger von Viren

Stechmücken spielen eine wichtige Rolle als Überträger (Vektoren) unterschiedlicher Infektionserreger, insbesondere von durch Arthropoden übertragenen Viren (Arboviren) (Muso et al. 2016). Bedingt durch Globalisierung und das hohe internationale Reiseaufkommen werden exotische Stechmückenarten und humanpathogene Arboviren regelmäßig weltweit verschleppt. So ist es in den vergangenen Jahren zu massiven Ausbreitungen verschiedener Arboviren, wie dem Dengue- (DENV), dem Chikungunya- (CHIKV) oder dem Zika-Virus (ZIKV) gekommen. Dies betrifft auch europäische Staaten wie z. B. Italien, Frankreich, Portugal oder Kroatien, in denen autochthone Ausbrüche der drei Arboviren in den letzten Jahren beobachtet werden konnten (Grandadam et al. 2011; Lühken et al. 2020; Schmidt-Chanasit et al. 2010, ECDC 2019).

In Deutschland wird seit Jahren ein signifikanter Eintrag tropischer Arboviren durch Fernreisende beobachtet (RKI 2020). Autochthone Übertragungen fanden bislang jedoch nicht statt. Es ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht absehbar, wie hoch das Risiko einer Übertragung tropischer Viren durch Stechmücken in Deutschland ist bzw. im Verlauf klimatischer Veränderungen sein wird. Die Vektorkompetenz von tropischen Arten wie der Asiatischen Tigermücke *Aedes albopictus*, die sich im Zuge ihrer weltweiten Ausbreitung mittlerweile auch in Deutschland stellenweise etabliert hat, ist gut untersucht (Lühken et al. 2020). Allerdings ist die Vektorkompetenz einheimischer Stechmückenarten kaum bekannt (Heitmann et al. 2017; Jansen et al. 2019). Darüber hinaus sind hierbei klimatische Veränderungen bislang weitestgehend unberücksichtigt geblieben, d. h. es fehlen Untersuchungen zur Vektorkompetenz der Stechmücken und zu möglichen Anpassungen an unterschiedliche Temperaturbedingungen. Dies gilt insbesondere für klimatische Bedingungen der gemäßigten Breiten.

Für das Übertragungsrisiko von Viren durch Stechmücken gilt die Umgebungstemperatur als eine der wichtigsten abiotischen Umweltfaktoren. Sowohl die Entwicklung der Stechmücken als auch die Replikation der Viren in den Insekten sind temperaturabhängig. Nur wenn die Abundanz der Vektoren und die Menge an Virus im Speichel der Stechmücken ein kritisches Level überschreiten, ist mit einem epidemischen Auftreten von Arbovirosen zu rechnen. Obwohl einige Stechmückenarten, wie die gemeine Hausmücke *Culex pipiens* oder die Rheinschnake *Aedes vexans* in einigen Gebieten Deutschlands mit hoher Abundanz zu finden sind, ist davon auszugehen, dass die in Deutschland vorherrschenden Temperaturen eine Entwicklung und Übertragung tropischer Erreger auch bei vorhandener Vektorkompetenz zum jetzigen Zeitpunkt nur in Ausnahmefällen erlauben. Allerdings könnte sich dies im Zuge der Klimaerwärmung ändern. Darüber hinaus werden Faktoren der Anpassung von Insekten und Viren in gängigen Szenarien in der Regel nicht berücksichtigt.

Vor diesem Hintergrund kann die Einschleppung tropischer Erreger problematisch sein. Es besteht Forschungsbedarf, die Vektorkompetenz abundanter einheimischer Stechmückenarten für häufig eingeschleppte Viren wie das DENV, CHIKV und ZIKV zu untersuchen, wobei unterschiedliche Temperaturbedingungen und die mögliche Adaptation der Viren an veränderte klimatische Bedingungen berücksichtigt werden sollen.

## 1.2 Arboviren in Deutschland und Zentraleuropa

Die letzten Jahre haben gezeigt, dass sich Arboviren in Europa geographisch ausbreiten. Ausbrüche des Usutu Virus (USUV) haben nicht nur eine fatale Auswirkung auf die Vogelpopulation (Lühken et al. 2017), mehr und mehr wird auch die klinische Relevanz sichtbar (Vilibic-Cavlek et al. 2014). Neben USUV gibt es seit 2018 auch die ersten autochthonen

Übertragungen von West-Nil-Virus (WNV) in Deutschland (Ziegler et al. 2018). Seitdem konnte jedes Jahr die Zirkulation des WNV in Deutschland beobachtet werden und in 2019 auch der erste durch Stechmücken übertragene autochthone humane WNV-Fall (Ziegler et al. 2020). Neben den schon in Deutschland vorkommenden Arboviren besteht zusätzlich die Gefahr der Neueinschleppung von bisher nicht endemischen Viren. Diese wächst bedingt durch die Globalisierung und das damit erhöhte Reiseaufkommen. Autochthone CHIKV- und DENV-Infektionen wurden wiederholt vom europäischen Festland gemeldet. Im Jahr 2007 verursachte ein Reisender aus Indien eine CHIKV-Epidemie in Italien mit mehr als zweihundert klinischen Fällen (Rezza et al. 2007). In der Folge wurde eine kleinräumige Zirkulation in Frankreich (2010, 2014, 2017) und ein größerer CHIKV-Ausbruch in Italien (2017) beobachtet (Delisle et al. 2015, ECDC 2017, Grandadam et al. 2011, Venturi et al. 2016). Auch mehrere autochthone DENV-Infektionen wurden in den letzten Jahren aus Frankreich und Kroatien gemeldet (Giron et al. 2015, Gjenero-Margan et al. 2011, La Ruche et al. 2010, Marchand et al. 2013, Schmidt-Chanasit et al. 2010, Succo et al. 2016). Darüber hinaus weisen jüngste Berichte die erste Beobachtung von sehr vereinzelt autochthonen ZIKV-Infektionen in Frankreich nach (ECDC 2019).

### 1.3 Adaptionsfähigkeit von Arboviren

Die Umgebungstemperatur gilt als wichtigster abiotischer Einflussfaktor für die Transmission von Arboviren. Der Zusammenhang ist jedoch nicht linear und abhängig von der Kombination von Virus- und Stechmückenart. Flaviviren wie ZIKV und DENV haben dabei ein hohes thermales Optimum bei 29°C, während es dagegen für WNV von der Vektorspezies abhängig ist und zwischen 24°C und 25°C liegt (Mordecai et al. 2019). Es ist zu erwarten, dass die Ausbreitungsgebiete tropischer Arboviren sich bei der anhaltenden Klimaerwärmung erweitern. Die hohe Fehlerrate der viralen RNA-Polymerase sorgt für eine hohe Mutationsrate bei RNA-Viren wie DENV, ZIKV, WNV oder CHIKV. Durch diese hohe Mutationsrate haben Arboviren die Fähigkeit, sich an neue Vektoren anzupassen. So konnte bereits gezeigt werden, dass durch bestimmte Mutationen im Genom von CHIKV das Virus die Asiatische Tigermücke *Ae. albopictus* effektiver infizieren kann (Weaver et al. 2020). Darüber hinaus ist zu erwarten, dass nicht nur Adaptionen an neue Stechmückenspezies möglich sind, sondern auch an gemäßigte Temperaturen. Solche Adaptionen an niedrigere Temperaturen wurden z.B. bereits für Influenza-Viren gezeigt (Romero-Tejeda et al. 2013) und könnten zur Verbreitung tropischer Arboviren in gemäßigten Zonen führen.

### 1.4 Notwendigkeit des Forschungsvorhabens

Die geographische Ausbreitung von Arboviren und ihrer bekannten Überträger sowie ein Anstieg der Temperaturen bedingt durch die Klimaerwärmung führen zu immer häufigeren autochthonen Übertragungen von vormals nicht in Deutschland vorkommenden Arboviren, wie WNV oder USUV und damit zu einem gesteigerten Risiko von größeren Ausbrüchen in der Zukunft. Weiterhin besteht die Gefahr der Neueinschleppung von bereits regelmäßig in Europa auftauchenden Viren wie DENV und CHIKV sowie neu auftretenden Viren wie ZIKV. Um geeignete vorbeugende Maßnahmen und Vorbereitungen für Maßnahmen im Falle eines Ausbruches treffen zu können, ist eine vorherige Risikoabschätzung essentiell. Dafür ist es wichtig, die Vektorkompetenz abundanter Stechmückenarten für exotische Viren und den Einfluss der Temperatur zu ermitteln. In einem letzten Schritt müssen dann Daten zu Vektorkompetenz, Klima, Abundanz von Vektorspezies und Bevölkerungsdichte zusammengebracht werden, um eine Risikoabschätzung zu treffen.

## 1.5 Forschungsziele

Im Rahmen der Klimafolgenforschung wurden in diesem Projekt das Vektorpotential ausgewählter einheimischer Stechmückenarten für CHIKV und DENV ermittelt sowie weiterführende Untersuchungen mit ZIKV und WNV durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden Freilandfänge bzw. Laborstämme verwendet.

Es wurden verschiedene Stechmückenarten untersucht, die als potentielle Vektoren in Frage kommen und die in entsprechender Abundanz in Deutschland verbreitet sind. Zu diesem Zweck wurden Fangorte identifiziert, an denen die zu untersuchenden Stechmücken in ausreichender Menge auftreten. Dabei sollten Stechmückenstämme der gleichen Art an mindestens zwei unterschiedlichen Standorten gesammelt werden, da die Vektorkompetenz auch innerhalb der Arten standortabhängig unterschiedlich ausgeprägt sein kann.

Im Rahmen der Laboruntersuchungen zur Vektorkompetenz der Stechmücken wurden Infektions- und Transmissionsraten sowie die Transmissionseffizienz der Erreger ermittelt. Dabei wurden aktuelle klimatische Bedingungen sowie höhere Temperaturen berücksichtigt, die zukünftig im Zuge der Klimaerwärmung auftreten können, d. h. alle Versuche wurden vergleichend bei mindestens vier unterschiedlichen Temperaturen zwischen 18°C und 27°C durchgeführt.

Darüber hinaus wurden in Zellkulturversuchen (Stechmückenzellen) überprüft, inwieweit sich die oben genannten Viren an unterschiedliche Temperaturen adaptieren können. Dies erlaubt es eine Abschätzung zu treffen, ob Mutationen im Genom der hier untersuchten Arboviren ggf. eine lokale Etablierung erlauben würden.

Zum Abschluss der Arbeiten wurden auf Basis der Ergebnisse zur Vektorkompetenz, der räumlichen Verbreitung der Stechmückenarten, der Populationsdichte des Menschen vor Ort und unter Einbeziehung der Temperaturbedingungen das lokale Ausbruchsrisiko für die hier untersuchten Arboviren beurteilt und damit bestehende und zukünftige Risikogebiete in Deutschland identifiziert. Diese Informationen erlauben die Entwicklung notwendiger Präventionsmaßnahmen zum Schutze der menschlichen Gesundheit.

## 2 Verwendete Virusstämme

### 2.1 Auswahl der Virusstämme

Für die Versuche wurden Virus-Stämme eingesetzt, die bei akuter Infektion aus Patienten/Stechmücken isoliert wurden (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Virusstämme**

	DENV 1	DENV 2	CHIKV	ZIKV	WNV
Herkunft	EVAg CNR_25329	EVAg CNR_25679	EVAg CNR_24/2014	O. Vapaplathi; (Driggers et al. 2016)	G Rossini (Rossini et al. 2011)
Ursprungsmaterial	Serum (human)	Serum (human)	Serum (human)	Fetales Gehirn (human)	Serum (human)
Ort der Isolation (Datum)	Toulon, France (2014)	Toulon, France (2014)	France (2014)	Finnland (2015)	Provinz Ferrara (2009)

### 2.2 Anzucht der Viren

#### 2.2.1 CHIKV

Anzucht in Vero ATTC, CPE über TCID50, Detektion der viralen RNA über Altona diagnostic KIT ist etabliert.

#### 2.2.2 ZIKV

Anzucht in Vero ATTC, CPE über TCID50, Detektion der viralen RNA über Altona diagnostic KIT ist etabliert.

#### 2.2.3 DENV

Bei dem Versuch der artifiziellen Infektion mittels infektiöser Blutmahlzeit konnte keine Infektion in *Ae. aegypti* oder *Ae. albopictus* etabliert werden. Bei der Titration der T0 Probe zeigte sich, dass das Blut-Virus-Gemisch nach dem Ansetzen nicht mehr infektiös war.

Der Literatur (Carrington et al. 2013) folgend wurden in der Fangsaison 2019 in weiteren Experimenten frische konzentrierte DENV Lösung für die Blutmahlzeit verwendet, da Einfrierprozeduren ein bekannter Auslöser für Verlust der Infektiosität sind. Die Titerbestimmung erfolgte parallel zu den Infektionsexperimenten. Zudem wurden weitere am BNITM vorhandene DENV Stämme verwendet, und neben den schwankenden Temperaturen wurde auch eine stabile Temperatur von 28°C genutzt. Getestet wurden die Laborstämme *Cx. pipiens biotype molestus*, *Cx. quinquefasciatus* und *Ae. aegypti* sowie *Cx. torrentium* Nord und *Ae. albopictus* (Freiburg) (Tabelle 2). Auch diese Änderungen der Infektionsexperimente führten zu keiner Infektion, auch nicht in dem als Positivkontrolle verwendeten Stamm *Ae. aegypti*.

Als Positivkontrolle wurde der bekannte DENV-Vektor *Ae. aegypti* intrathorakal mit DENV infiziert. Bei einer Temperatur von 27±5°C konnte 14 Tage nach Injektion eine Infektion mit DENV festgestellt, jedoch keine Transmission detektiert werden. Die intrathorakale Injektion weicht durch die künstliche Umgehung der Darmbarriere jedoch stark von der natürlichen

Infektionsroute ab und kann daher nicht verwendet werden, um die Vektorkompetenz von Stechmückenarten zu bestimmen. Innerhalb der Förderperiode konnte daher kein Infektionsmodell etabliert werden, um die Vektorkompetenz für DENV zu bestimmen und eine Risikoanalyse für Deutschland vorzunehmen.

#### **2.2.4 WNV**

Anzucht in Vero ATTC oder A549/BVDV-Npro Zellen, welche das Npro Protein vom Bovine-Virusdiarrhoe-Virus stabil exprimieren (Hilton et al. 2006), CPE in Vero ATTC über TCID50, RNA über Altona diagnostic KIT ist etabliert.

### 3 Stechmückenspezies

#### 3.1 Auswahl der zu untersuchenden Stechmücken und Fangorte

Die Vektorkompetenz von Stechmücken derselben Art kann sich in Abhängigkeit vom Standort unterscheiden (Huber et al. 2014, Roundy et al. 2017). Daher sollten Stechmücken von jeweils zwei räumlich weit voneinander getrennten Standorten in Deutschland in die Untersuchung einbezogen werden. Aufgrund langjähriger Erfahrung mit Stechmückenfängen sind den Mitarbeiter\*innen des BNITM entsprechende Standorte bekannt. Stechmücken wurden als Eigelege, als Larven oder als Adulte im Feld gesammelt.

Stechmücken der Gattung *Culex* wurden wie bereits früher beschrieben (Leggiewie et al. 2016, Jansen et al. 2019) als Ei-Gelege in Baden-Württemberg und Hamburg gesammelt, im BNITM im Larvenstadium genetisch bestimmt und artenrein zu Adulten herangezogen (Rudolf et al. 2013).

Da *Ae. vexans* die Eier nur vereinzelt im Boden ablegt, kann diese Spezies nicht in Form von Eigelegen gesammelt werden, sondern wird im Adultstadium gefangen. Je nach Witterungslage sollten ca. 10 bis 15 Tage nach einem Starkregenereignis oder nach dem ersten Frühjahrshochwasser adulte Exemplare von *Ae. vexans* in Baden-Württemberg (Rhein) und Brandenburg (Oder) gefangen und in das BNITM gebracht werden. *Aedes vexans* konnte jedoch erfolgreich nur am Standort Heidelberg gefangen werden. Dabei wurde dort zusätzlich die Art *Ae. sticticus* gefangen und in dieser Studie untersucht, da nur wenig *Ae. vexans* zur Verfügung standen. Aus demselben Grund wurde *Ae. detritus*, eine halophile Stechmückenart, von der Insel Baltrum untersucht, die im Hinblick auf das Vektorpotential besonders interessant ist, weil sie eine starke Präferenz für den Menschen aufweist (Becker et al. 2020).

Die Eier der in Deutschland und Italien exotischen Stechmückenspezies *Ae. albopictus* wurden 2017 am Standort Freiburg, Deutschland; bzw. 2016 am Standort Kalabrien, Italien gesammelt und in Insektarien des BNITM für maximal fünf bis sieben Generationen gehalten und vermehrt.

Ein Laborstamm von *Ae. aegypti* (am BNITM seit Jahren vorhanden) wurde als Positiv-Kontrolle zusätzlich für die Vektorkompetenzstudien eingesetzt.

**Tabelle 2: Fangorte der Stechmückenspezies**

Stechmückenspezies	Fangort	Datum der Probennahme	Fangart
<i>Aedes albopictus</i>	Freiburg	2017	Eigelege
<i>Aedes detritus</i>	Baltrum	2017, 2018	Larven/Puppen
<i>Aedes sticticus</i>	Rhein	2018, 2021	Adulte
<i>Aedes vexans</i>	Rhein	2019, 2021	Adulte
<i>Aedes vexans</i>	Oder	keine erfolgreichen Fänge	Adulte
<i>Culex</i> spp.	Hamburg, Heidelberg	2017-2019	Eigelege

## 4 Laboruntersuchungen zum Vektorpotential einheimischer Stechmücken

Die Vektorkompetenzstudien wurden bei vier durchschnittlichen Temperaturen (18°C, 21°C, 24°C, 27°C) mit der Simulation eines Tag-/Nachtrhythmus durch eine Schwankung von  $\pm 5^\circ\text{C}$  pro 24 Stunden durchgeführt. Für CHIKV wurde an Stelle von 27°C eine niedrigere Temperatur von 15°C untersucht, da aus Vorversuchen schon bekannt war, dass die Übertragung von CHIKV auch bei niedrigen Temperaturen möglich ist und somit eine besonders wichtige Rolle in der Risikoabschätzung in Zentraleuropa spielt.

Für die Untersuchung der Vektorkompetenz einheimischer Stechmücken für CHIKV, ZIKV und WNV wurden artifizielle Blutmahlzeiten durchgeführt, d.h. die Blutmahlzeit an einem infizierten Wirt wurde künstlich im Labor nachgestellt. Hierfür wurden abgelaufene Blutkonserven mit dem jeweiligen Virusstock versetzt und den Stechmücken angeboten. Die Stechmücken wurden nach erfolgreicher Blutmahlzeit in Inkubatoren mit festgelegter Temperatur- und Luftfeuchtigkeit für einen festen Zeitraum gehalten. Die ersten Untersuchungen wurden unter konstanten Temperaturen von 18°C, 21°C, 24°C und 27°C durchgeführt, bei einer Luftfeuchtigkeit von 70%. Durch die Anschaffung neuer Inkubatoren konnten die Untersuchungen dann im Folgenden bei schwankenden Temperaturen von jeweils  $\pm 5^\circ\text{C}$  innerhalb von 24 Stunden fortgeführt werden, was die Simulation eines Tag-Nacht-Rhythmus ermöglichte. Daher wurden die zuerst durchgeführten Untersuchungen mit ZIKV bei konstanten Temperaturen durchgeführt, die späteren Untersuchungen mit CHIKV und WNV bei schwankenden Temperaturen. Die Replikation (Vervielfältigung) von Viren variiert zwischen den einzelnen Viruspezies und muss in den Untersuchungen berücksichtigt werden. CHIKV weist eine hohe Replikationsrate auf, daher wurden die Stechmücken 7 bzw. 14 Tage nach der Blutmahlzeit untersucht. Die Replikation von ZIKV und WNV verläuft etwas langsamer, daher wurden die Stechmücken 14 bzw. 21 Tage nach Infektion untersucht. Es wurde angestrebt, für jede untersuchte Kombination Zeitpunkt/Temperatur/Stechmückenspezies/Virus 30 Individuen im Speichelassay zu analysieren, um biologisch relevante Aussagen treffen zu können. Nach festgelegter Inkubationszeit wurden die Stechmücken auf folgende Parameter untersucht:

- Infektionsrate (IR): Die Anzahl der virus-positiven Körper im Verhältnis zur Gesamtzahl der blutgesogenen Stechmücken
- Transmissionsrate (TR): Die Anzahl der virus-positiven Speichel im Verhältnis zu der Zahl positiver Körper
- Transmissionseffizienz (TE): Die Anzahl der virus-positiven Speichel im Verhältnis zur Gesamtzahl der blutgesogenen Stechmücken

Die IR beurteilt, ob ein bestimmtes Virus eine Stechmücke infizieren kann, sagt jedoch nichts über die tatsächliche Transmission (Übertragung) des Virus aus. Die Transmission wird als TR oder TE angegeben. Für die Beurteilung der Vektorkompetenz einer Stechmückenspezies für ein bestimmtes Virus ist die TE am aussagekräftigsten, da diese alle blutgesogenen Stechmücken eines Experimentes einbezieht. Da in vielen wissenschaftlichen Artikeln jedoch nur die TR angegeben wird, wird diese im Folgenden auch aufgeführt, diskutiert wird jedoch ausschließlich die TE. Eine TE unter 15% ist als niedrig und zwischen 15% und 30% als mittel einzustufen. Ab 30% kann von einer hohen TE gesprochen werden. Für die Einschätzung eines Übertragungsrisikos eines bestimmten Arbovirus durch eine Stechmückenspezies müssen zusätzlich zur TE auch noch weitere Parameter berücksichtigt werden, beispielsweise die

Abundanz der Stechmückenspezies und die Dichte der Bevölkerung, dies wird in Abschnitt 6 durchgeführt.

Alle Experimente wurden im BSL3-Insektarium am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin durchgeführt.

## 4.1 Stechmücken der Gattung *Culex*

Da bei den Fängen von *Cx. torrentium* auch *Cx. pipiens* gesammelt wurde, wurden auch diese auf eine Vektorkompetenz für CHIKV und ZIKV untersucht.

### 4.1.1 *Culex torrentium*

#### 4.1.1.1 CHIKV

*Culex torrentium* (Norddeutschland) zeigte nach 14 Tagen eine Transmission bei  $24^{\circ}$ - $27^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$  auf, allerdings mit niedrigen TEs von ca. 3% (Tabelle 3). Nach 7 Tagen konnte bei dieser Population nur bei der höchsten Temperatur von  $27^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$  eine TE von 11,8% festgestellt werden. Im Gegensatz zu der nördlichen Population konnte bei der Population aus Süddeutschland bei  $27\pm 5^{\circ}\text{C}$  nur 7 Tage nach der Infektion eine Transmission beobachtet werden, diese TE war mit 25% doppelt so hoch (Tabelle 4). Bei  $24^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$  konnte zu beiden Zeitpunkten Transmission nachgewiesen werden, im mittleren Bereich nach 7 Tagen (TE 11,6%) und im niedrigen Bereich (TE 1,4%) nach 14 Tagen. Interessanterweise konnte für die Süddeutsche Population auch eine Transmission bei  $18^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$  festgestellt werden mit einer TE von 6,1% nach 14 Tagen (Tabelle 4).

Die Untersuchung der Populationen aus zwei verschiedenen Standorten in Deutschland zeigte Unterschiede zwischen den Populationen auf, allerdings ist ein klarer Trend zur temperaturabhängigen Übertragung von CHIKV durch *Cx. torrentium* zu erkennen.

**Tabelle 3: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Chikungunya Virus in *Culex torrentium* aus Norddeutschland**

Temperatur [°C]	Tage nach Infektion	Individuen	IR [%]	TR [%]	TE [%]
18±5	7	30	33,3	0,0	0,0
18±5	14	40	65,0	0,0	0,0
21±5	7	33	21,2	0,0	0,0
21±5	14	24	50,0	0,0	0,0
24±5	7	30	76,7	0,0	0,0
24±5	14	30	66,7	5,0	3,3
27±5	7	34	91,2	12,9	11,8
27±5	14	30	30,0	11,1	3,3

**Tabelle 4: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Chikungunya Virus in *Culex torrentium* aus Süddeutschland**

Temperatur [°C]	Tage nach Infektion	Individuen	IR [%]	TR [%]	TE [%]
18±5	7	31	100,0	0,0	0,0
18±5	14	49	87,8	7,0	6,1
21±5	7	30	86,7	0,0	0,0
21±5	14	34	64,7	0,0	0,0
24±5	7	43	74,4	15,6	11,6
24±5	14	72	66,7	2,1	1,4
27±5	7	32	100,0	25,0	25,0
27±5	14	31	74,2	0,0	0,0

**4.1.1.2 ZIKV**

*Culex torrentium* zeigte im gesamten untersuchten Temperaturspektrum von 18°C-27°C keine Vektorkompetenz für ZIKV auf (Heitmann et al. 2017).

**4.1.2 *Culex pipiens* biotype *pipiens***

**4.1.2.1 CHIKV**

*Culex pipiens* zeigte nur 7 Tage nach Infektion bei der höchsten Temperatur von 27°±5°C eine niedrige Transmissionseffizienz von 3,5% für CHIKV auf (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Chikungunya Virus in *Culex pipiens* aus Norddeutschland**

Temperatur [°C]	Tage nach Infektion	Individuen	IR [%]	TR [%]	TE [%]
18±5	14	30	23,3	0,0	0,0
18±5	7	30	26,7	0,0	0,0
21±5	14	30	10,0	0,0	0,0
21±5	7	30	56,7	0,0	0,0
24±5	14	30	33,3	0,0	0,0
24±5	7	36	72,2	0,0	0,0
27±5	14	30	16,7	0,0	0,0
27±5	7	29	62,1	5,6	3,5

#### 4.1.2.2 ZIKV

*Culex* spp. zeigte im gesamten untersuchten Temperaturspektrum von 18°C-27°C keine Vektorkompetenz für ZIKV auf (Heitmann et al. 2017).

## 4.2 Exotische Stechmücken der Gattung *Aedes*

### 4.2.1 *Aedes aegypti*

*Aedes aegypti* Stechmücken wurden zur Kontrolle mit ZIKV infiziert, Transmission zeigte sich nur bei 27°C, 14 Tage und 21 Tage nach Infektion mit einer TE von 45% bzw. 31%, bei 18°C konnte keine Transmission festgestellt werden (Heitmann et al. 2017).

### 4.2.2 *Aedes albopictus*

#### 4.2.2.1 CHIKV

Die Infektionen mit CHIKV wurden in einem ersten Schritt mit stabilen Inkubationstemperaturen durchgeführt. Unabhängig von der Herkunft der *Ae. albopictus* Populationen (Deutschland und Italien) sowie der Temperatur (18°C, 21°C, 24°C) konnten unter allen Bedingungen infektiöse Partikel im Speichel festgestellt werden (Tabelle 6,

Tabelle 7). Auffallend ist, dass mit sinkender Inkubationstemperatur die Transmissioneffizienz steigt. Der höchste Wert bei der Population aus Deutschland lag bei 18°C mit einer TE von 50% (Tabelle 6), bei der italienischen Population wurden mit einer TE von 63% bei 18°C und 21°C ähnlich hohe Werte erreicht. Die Ergebnisse wurden veröffentlicht (Heitmann et al. 2018).

**Tabelle 6: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Chikungunya Virus in *Aedes albopictus* aus Deutschland**

Temperatur [°C]	Tage nach Infektion	Individuen	IR [%]	TR [%]	TE [%]
18	14	32	100,0	50,0	50,0
21	14	23	100,0	39,1	39,1
24	14	24	100,0	37,5	37,5

**Tabelle 7: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Chikungunya Virus in *Aedes albopictus* aus Italien**

Temperatur [°C]	Tage nach Infektion	Individuen	IR [%]	TR [%]	TE [%]
18	14	30	100,0	63,3	63,3
21	14	30	100,0	63,3	63,3
24	14	24	100,0	38,6	38,6



Die Experimente wurden für die deutsche *Ae. albopictus* Population bei schwankenden Temperaturen wiederholt ( $24\pm 5^{\circ}\text{C}$  -  $18\pm 5^{\circ}\text{C}$ ), um den Tag-Nacht-Rhythmus zu simulieren. Zusätzlich wurde eine höhere Temperatur ( $27\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) und eine niedrigere Temperatur ( $15\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) untersucht (Tabelle 8).

Es zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen schwankenden und nicht schwankenden Temperaturen. Auch bei  $27\pm 5^{\circ}\text{C}$  und  $15\pm 5^{\circ}\text{C}$  konnte eine hohe Transmission detektiert werden.

**Tabelle 8: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Chikungunya Virus in *Aedes albopictus* aus Deutschland**

Temperatur [°C]	Tage nach Infektion	Individuen	IR [%]	TR [%]	TE [%]
15±5	14	40	100,0	32,5	32,5
18±5	14	35	100,0	54,3	54,3
21±5	14	30	96,7	62,0	60,0
24±5	14	40	100,0	32,5	32,5
27±5	14	42	100,0	50,0	50,0

#### 4.2.2.2 ZIKV

Beide untersuchten Populationen von *Ae. albopictus* (Deutschland und Italien) wiesen eine Transmission von ZIKV bei  $27^{\circ}\text{C}$  auf, jedoch keine Transmission bei  $18^{\circ}\text{C}$  (Tabelle 9, Tabelle 10). 14 Tage nach Infektion lag die TE bei  $27^{\circ}\text{C}$  für beide Populationen mit 13% im niedrigen Bereich, 21 Tage nach Infektion ist die TE der deutschen Population mit 18% (Tabelle 9) schon im mittleren Bereich und mehr als doppelt so hoch wie die TE der italienischen Population mit 7% (Tabelle 10). Die Ergebnisse wurden veröffentlicht (Heitmann et al. 2017).

**Tabelle 9: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Zika Virus in *Aedes albopictus* aus Deutschland**

Temperatur [°C]	Tage nach Infektion	Individuen	IR [%]	TR [%]	TE [%]
18	14	32	12,5	0,0	0,0
18	21	34	34,4	0,0	0,0
27	14	31	64,5	20,0	12,9
27	21	34	52,9	33,3	17,6

**Tabelle 10: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Zika Virus in *Aedes albopictus* aus Italien**

Temperatur [°C]	Tage nach Infektion	Individuen	IR [%]	TR [%]	TE [%]
18	14	30	63,3	0,0	0,0
18	21	39	35,9	0,0	0,0
27	14	31	71,0	18,2	12,9
27	21	29	51,7	13,3	6,9

### 4.3 Einheimische *Aedes*-Arten

#### 4.3.1 *Aedes vexans*

Stechmücken der Art *Ae. vexans* wurden bei Massenaufreten gefangen und als adulte Individuen an das Bernhard-Nocht-Institut verschickt. Hierbei wurden regelmäßig auch *Ae. sticticus* gefangen, da diese Stechmückenart eine ähnliche ökologische Nische besiedelt. Die Experimente wurden daher zusätzlich auch mit *Ae. sticticus* durchgeführt.

##### 4.3.1.1 CHIKV

Eine Transmission von CHIKV konnte nur 14 Tage nach Infektion bei jeweils einer einzelnen Mücke bei  $21^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$  sowie  $27^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$  festgestellt werden (TE 7,1%/2,9%), für alle anderen Zeitpunkte/Temperaturen konnte keine Transmission nachgewiesen werden (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Chikungunya Virus in *Aedes vexans***

Temperatur [°C]	Tage nach Infektion	Individuen	IR [%]	TR [%]	TE [%]
18±5	7	30	63,3	0,0	0,0
18±5	14	22	31,8	0,0	0,0
21±5	7	30	62,1	0,0	0,0
21±5	14	14	71,4	10,0	7,1
24±5	7	30	86,7	0,0	0,0
24±5	14	31	45,2	0,0	0,0
27±5	7	30	60,0	0,0	0,0
27±5	14	34	58,8	5,0	2,9

#### 4.3.1.2 ZIKV

Bei konstanten Temperaturen von 21°C, 24°C und 27°C konnte keine Transmission von ZIKV durch *Ae. vexans* festgestellt werden, weder 14 noch 21 Tage nach Infektion (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Zika Virus in *Aedes vexans***

Temperatur [°C]	Tage nach Infektion	Individuen	IR [%]	TR [%]	TE [%]
21	14	12	0,0	0,0	0,0
21	21	17	17,6	0,0	0,0
24	14	24	16,7	0,0	0,0
24	21	27	40,7	0,0	0,0
27	14	31	45,2	0,0	0,0
27	21	25	32,0	0,0	0,0

#### 4.3.1.3 WNV

Die Infektion von *Ae. vexans* mit WNV konnte nicht mit ausreichend Individuen durchgeführt werden. In den durchgeführten Experimenten bei 27°±5°C konnte keine Transmission von WNV festgestellt werden (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für West-Nil-Virus in *Aedes vexans***

Temperatur [°C]	Tage nach Infektion	Individuen	IR [%]	TR [%]	TE [%]
27±5	14	16	81,3	0,0	0,0

### 4.3.2 *Aedes sticticus*

#### 4.3.2.1 CHIKV

Es konnte eine temperaturabhängige Transmission von CHIKV bei *Ae. sticticus* festgestellt werden. Während bei 24°±5°C eine hohe TE von 33,3% aufgezeigt wurde, betrug die TE bei 21°±5°C nur 3,8%, und bei 18°±5°C konnten gar keine CHIKV-positiven Speichel mehr festgestellt werden (Tabelle 14). Aufgrund der begrenzten Anzahl der zur Verfügung stehenden Individuen für die Experimente wurde davon abgesehen, diese bei 27°±5°C durchzuführen, da diese Bedingungen in Deutschland am seltensten vorkommen.

**Tabelle 14: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Chikungunya Virus in *Aedes sticticus***

Temperatur [°C]	Tage nach Infektion	Individuen	IR [%]	TR [%]	TE [%]
18±5	14	32	78,1	0,0	0,0
21±5	14	26	76,9	5,0	3,8
24±5	14	12	91,7	36,4	33,3

#### 4.3.2.2 WNV

Die Infektion von *Ae. sticticus* mit WNV wurde zunächst bei zwei höheren Temperaturen durchgeführt, da bekannt ist, dass WNV temperaturabhängige TEs aufweist, d.h. höhere TEs bei höheren Temperaturen. In den durchgeführten Experimenten konnte keine Transmission von WNV detektiert werden (Tabelle 15). Daher wurde von Experimenten bei niedrigeren Temperaturen abgesehen.

**Tabelle 15: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für West-Nil-Virus in *Aedes sticticus***

Temperatur [°C]	Tage nach Infektion	Individuen	IR [%]	TR [%]	TE [%]
27±5	14	25	0,0	0,0	0,0
24±5	14	22	4,5	0,0	0,0

#### 4.3.3 *Aedes detritus*

Zusätzlich wurde die halophile Stechmückenspezies *Ae. detritus* untersucht, welche als Puppen/Larven auf Baltrum gesammelt wurde. Im Gegensatz zu allen anderen bisher aufgeführten Untersuchungen mit ZIKV wurden hier schwankende Temperaturen für die Inkubation verwendet. Aufgrund der Corona-Pandemie musste von weiteren Reisen nach Baltrum abgesehen werden, und die Experimente konnten nicht mit ausreichend Individuen und bei allen geplanten Temperaturen durchgeführt werden.

##### 4.3.3.1 ZIKV

Bei einer Temperatur von 27°±5°C konnte 14 Tage nach Infektion eine niedrige Transmissionseffizienz von 13,3% festgestellt werden. Bei 24°±5°C konnte 14 Tage nach Infektion keine Transmission, zu dem späteren Zeitpunkt von 21 Tagen nach Infektion allerdings eine hohe Transmissionseffizienz von 30,3% beobachtet werden (Tabelle 16).

**Tabelle 16: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für Zika Virus in *Aedes detritus***

Temperatur [°C]	Tage nach Infektion	Individuen	IR [%]	TR [%]	TE [%]
27±5	14	15	93,3	14,3	13,3
24±5	14	35	82,9	0,0	0,0
24±5	21	10	90,0	33,3	30,3

#### 4.3.3.2 WNV

Die Vektorkompetenzstudien mit *Ae. detritus* für WNV wurden bei konstanten Temperaturen durchgeführt. Es konnten nicht ausreichend Individuen angezogen werden, um die Experimente abzuschließen, allerdings konnte bisher bei keiner der untersuchten Temperaturen von 27°C, 21°C und 18°C eine Transmission festgestellt werden (Tabelle 17).

**Tabelle 17: Infektionsrate (IR), Transmissionsrate (TR) und Transmissionseffizienz (TE) für West-Nil-Virus in *Aedes detritus***

Temperatur [°C]	Tage nach Infektion	Individuen	IR [%]	TR [%]	TE [%]
24	14	13	15,4	0,0	0,0
21	14	19	5,3	0,0	0,0
18	14	17	0,0	0,0	0,0
18	21	13	0,0	0,0	0,0

## 5 Laboruntersuchungen zur Adaptionfähigkeit

Die Umgebungstemperatur gilt als wichtigster abiotischer Einflussfaktor für die Transmission von Arboviren. Frühere Ergebnisse haben gezeigt, dass ein Großteil der Arboviren am besten bei höheren Temperaturen repliziert. Die hohe Mutationsrate von Arboviren gibt ihnen jedoch die Fähigkeit, sich an neue Umstände anzupassen, wie z.B. Temperatur. Mehrmaliges Passagieren von Arboviren in Stechmückenzellen bei niedrigen Temperaturen zusammen mit Wachstumskinetiken und Sequenz-Analysen der resultierenden Viren ermöglichen eine Einschätzung der Adaptionfähigkeit der untersuchten Viren an niedrigere Temperaturen.

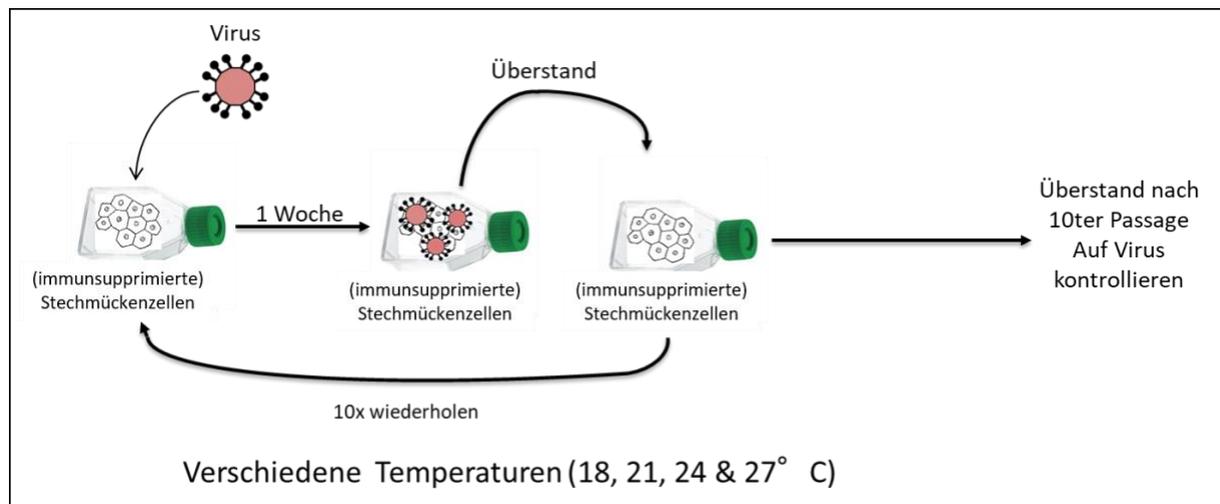
**Tabelle 18: Genutzte Zelllinien**

Zelllinie	Spezies	Besonderheiten	Genutzt für die Versuche
C6/36	<i>Aedes albopictus</i>	Immunsupprimiert	Adaption (DENV, ZIKV), Wachstumskurven (ZIKV)
U4.4	<i>Aedes albopictus</i>	-	Wachstumskurven (ZIKV)
Aag2-AF319	<i>Aedes aegypti</i>	Immunsupprimiert	Adaption (DENV, ZIKV)
Ct	<i>Culex tarsalis</i>	-	Adaption, Wachstumskurven (WNV)
A549/BVDV-Npro	<i>Homo sapiens</i>	Immunsupprimiert	Wachstumskurven (ZIKV)
Vero	<i>Chlorocebus sp.</i>	-	Wachstumskurven (WNV)

### 5.1 Anpassungen an niedrige Temperaturen

In den Vektorkompetenzstudien zeigte sich, dass CHIKV auch schon bei 15°C in *Ae. albopictus* repliziert (Heitmann et al. 2018). Weitere Adaptionsversuche an niedrigere Temperaturen waren daher nicht nötig. Die Adaptionsversuche in Zellkultur wurden deshalb nur mit DENV-1, DENV-2, ZIKV und ergänzend WNV durchgeführt (Abbildung 1). Alle Versuche in Stechmückenzellen wurden bei schwankenden Temperaturen ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) durchgeführt, mit durchschnittlichen Temperaturen von 18°C, 21°C, 24°C und 27°C. Im folgenden Verlauf werden die temperaturadaptierten Viren anhand der Durchschnittstemperatur benannt.

**Abbildung 1: Schema der experimentellen Anpassung von DENV, ZIKV und WNV an niedrige Temperaturen.**



Stechmückenzellen werden mit Virus (DENV 1, DENV 2, ZIKV oder WNV) infiziert und bei unterschiedlichen durchschnittlichen Temperaturen mit ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) Schwankungen inkubiert ( $18^\circ\text{C}$ ,  $21^\circ\text{C}$ ,  $24^\circ\text{C}$  oder als Kontrolle  $27^\circ\text{C}$ ). Nach einer Woche wird ein Teil des Zellüberstandes auf neue Zellen transferiert und für 1 Woche inkubiert. Dies wird 10-mal wiederholt. Hiernach wird die Anwesenheit des Virus kontrolliert. Quelle: eigene Darstellung, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin.

Weder ZIKV noch beide DENV Stämme konnten über 10 Wochen bei  $18^\circ\pm 5^\circ\text{C}$  passagiert werden. Jedoch konnten für ZIKV, DENV 1 und WNV infektiöse Überstände nach 10 Passagen bei  $21^\circ\pm 5^\circ\text{C}$  und  $24^\circ\pm 5^\circ\text{C}$  hergestellt werden.

## 5.2 Charakterisierung der Mutationen mittels NGS

Eine genomische Sequenzierung und Varianten Analyse von Aminosäure Punktmutationen der angepassten Stämme und der Original Stämme als Kontrolle wurde durch die BNITM Next Generation Sequencing (NGS) Core Facility durchgeführt.

### 5.2.1 DENV

Bei DENV 1 wurden Mutationen in unterschiedlichen Teilen des Virusgenoms gefunden, wobei die meisten Mutationen in den temperaturadaptierten Stämmen vorkamen und nicht in dem Kontroll-Virus, welches bei  $27^\circ\text{C}$  passagiert wurde (Abbildung 2). Da eine Durchführung von Vektorkompetenzstudien mit DENV sich als technisch nicht durchführbar dargestellt hatte (siehe 2.2.3), wurde auf die Durchführung weiterer Zellkulturversuche verzichtet.

### 5.2.2 ZIKV

Bei ZIKV wurden ebenfalls Mutationen in unterschiedlichen Teilen des Virusgenoms festgestellt (Abbildung 2). Die meisten davon waren nicht nur in den temperaturadaptierten Stämmen nachzuweisen, sondern auch in dem bei  $27^\circ\text{C}$  für 10 Wochen passagierten Stock. Jedoch wurden hier unterschiedliche Mutationen gefunden in Viren, die in *Ae. aegypti*-Zellen passagiert wurden im Vergleich zu Viren, welche in *Ae. albopictus*-Zellen passagiert wurden. Dies lässt

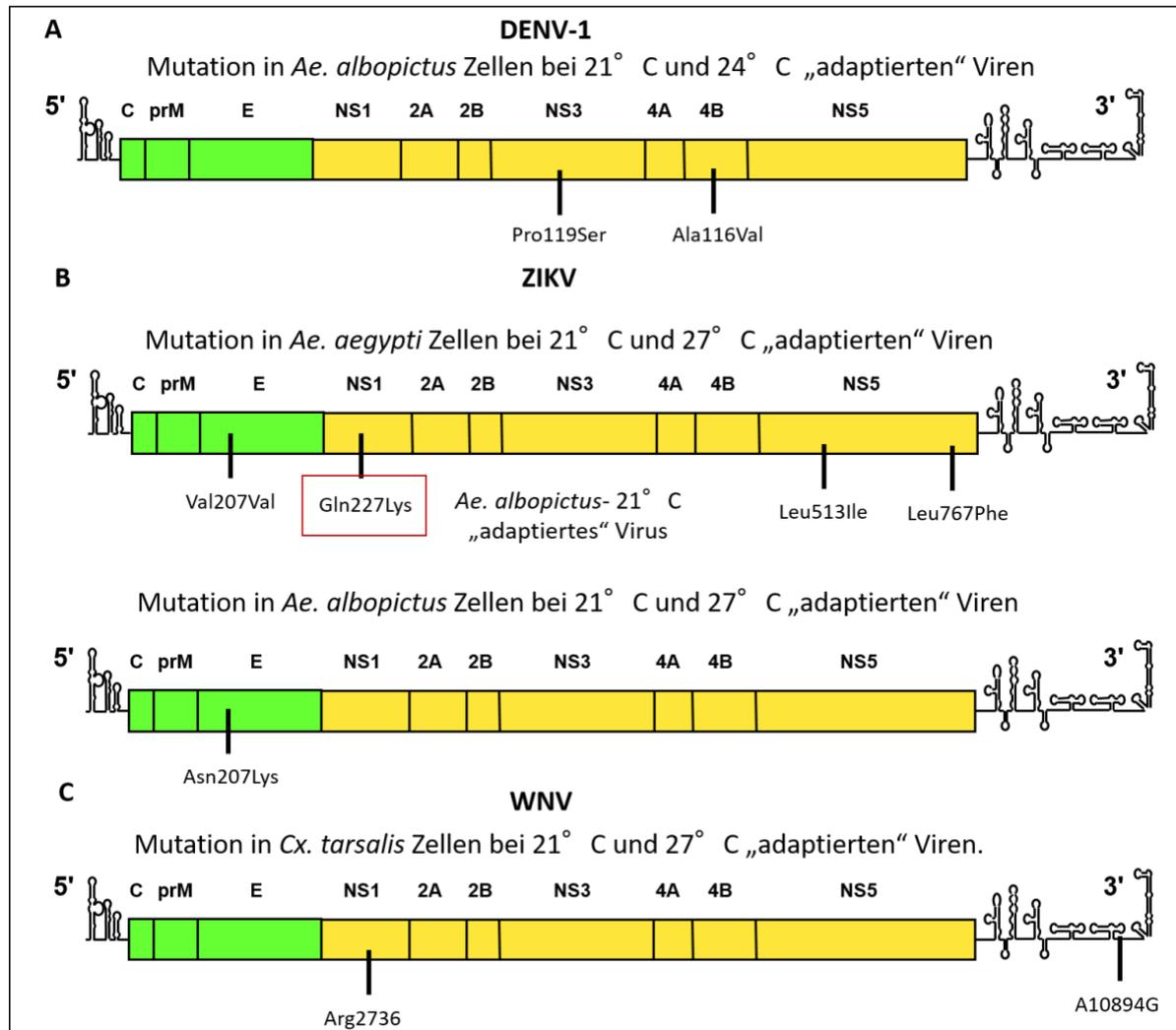
darauf schließen, dass ZIKV sich auch bei gleicher Temperatur an die Stechmücken spezifische Zellkultur anpasst. Eine Ausnahme ist eine Mutation im NS1 Protein (Gln227Lyx), die in *Ae. aegypti*-Zellen bei 21°C und 27°C passagierten Viren wie auch in Viren, welche in *Ae. albopictus*-Zellen bei 21°C passagiert wurden, anwesend war. Die Anwesenheit der Mutation in Viren, welche in unterschiedlichen Stechmückenzellen passagiert wurden (21°C und 27°C), lässt darauf schließen, dass dies keine Spezies-spezifische Anpassung ist, sondern eine allgemeine Anpassung an die Zellkultur.

### 5.2.3 WNV

Für WNV wurden Mutationen in unterschiedlichen Teilen des Virusgenoms nachgewiesen (Abbildung 2). Ein Teil dieser Mutationen bei den „adaptierten“ Viren bei 21°C und 27°C wurden nur in den Viren gefunden, welche direkt nach Passagieren in den Stechmückenzellen sequenziert wurden. Diese Mutationen in der Nukleotidsequenz resultierten auch in Änderungen der kodierten Aminosäuren. Jedoch gingen diese Mutationen schon nach einer Amplifikationsrunde in Säugetierzellen verloren. Daher kann man davon ausgehen, dass sie Stechmücken-spezifisch sind. Ausnahmen bildeten zwei Mutationen, welche in den „adaptierten“ Viren bei 21°C und 27°C von den Stechmücken- und Säugetierzellen, zu finden waren. Diese sind: (i) eine Änderung in der Nukleotidsequenz im NS1 Protein (G8304A; Arg2736), welche aber nicht zu einer Änderung in der Aminosäuresequenz führt und (ii) eine Mutation im 3'UTR (nicht für Protein kodierendes Ende am 3' Ende des Genoms; A10894G). In den „adaptierten Viren“ bei 24°C wurde in der Sequenz keine fixierte Mutation (welche in allen sequenzierten Sequenzen dieses Samples anwesend war) gefunden. In allen „adaptierten Viren“ (21°C, 24°C und 27°C) wurden unterschiedliche nicht fixierte Mutationen (welche nur in einem Prozentteil der sequenzierten Virussequenzen eines Samples detektiert wurden) gefunden. Ein paar dieser nicht fixierten Mutationen waren in allen „adaptierten Viren“ (21°C, 24°C und 27°C) gleich (z.B. Thr699Ile und Leu1157).

Zusammen genommen kann man daraus schließen, dass WNV sich an die Stechmückenzellen anpasst, jedoch nicht an die niedrigeren Temperaturen.

Abbildung 2: Sequenzierung und Mutationsanalyse der „adaptierten“ DENV-1, ZIKV und WNV Viren.



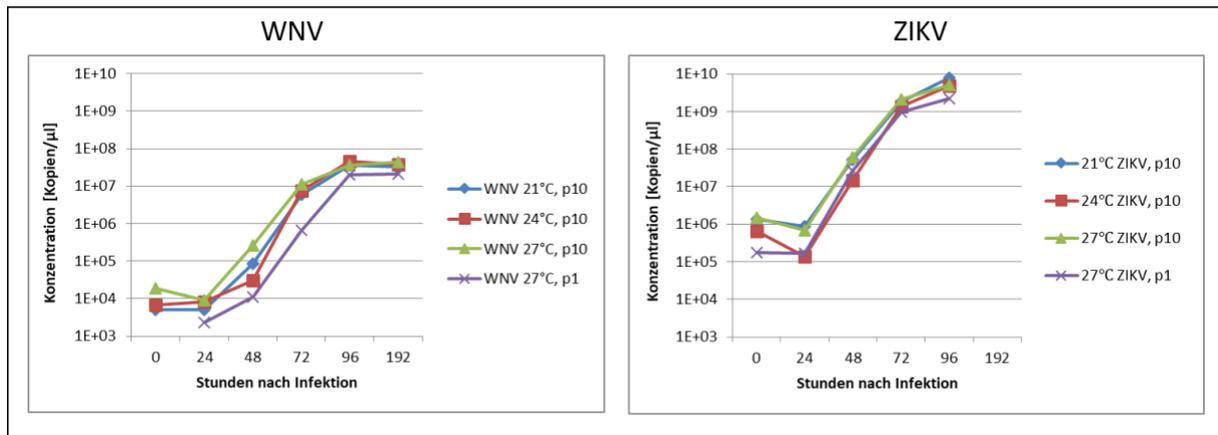
Die unterschiedlichen „adaptierten“ und ursprünglichen Viren: (A) DENV-1, (B) ZIKV und (C) WNV wurden sequenziert und Mutationen im Genom der „adaptierten“ Viren identifiziert. Quelle: eigene Darstellung, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin.

### 5.3 Infektiosität in Säugetierzellen

Als erstes wurde überprüft, ob die „adaptierten“ Viren noch Säugetierzellen erfolgreich infizieren können.

Hierfür wurden Wachstumskinetiken von ZIKV und WNV bei 37°C auf Säugetierzellen (A549Npro für ZIKV und Vero für WNV) durchgeführt. Es wurden die Viren genutzt, welche in C6/36- (ZIKV) oder Ct-Zellen (WNV) bei unterschiedlichen Temperaturen (21°C, 24°C, 27°C) passagiert worden waren. Diese wurden vor Verwendung einmal in Säugetierzellen amplifiziert, um eine ausreichende Viruskonzentration zu generieren.

**Abbildung 3: Wachstumskurven von „temperaturangepassten“ ZIKV und WNV in Säugetierzellen.**



Säugetierzellen (A549nPro für ZIKV oder Vero für WNV) wurden mit der gleichen Konzentration von unterschiedlichen „adaptierten“ ZIKV oder WNV Stocks (21°C, 24°C oder 27°C, p10; nach Passage 10) oder dem Original-Stock (27°C, p1, nach Passage 1) als Kontrolle infiziert. RNA in den Überständen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Quelle: eigene Darstellung, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin.

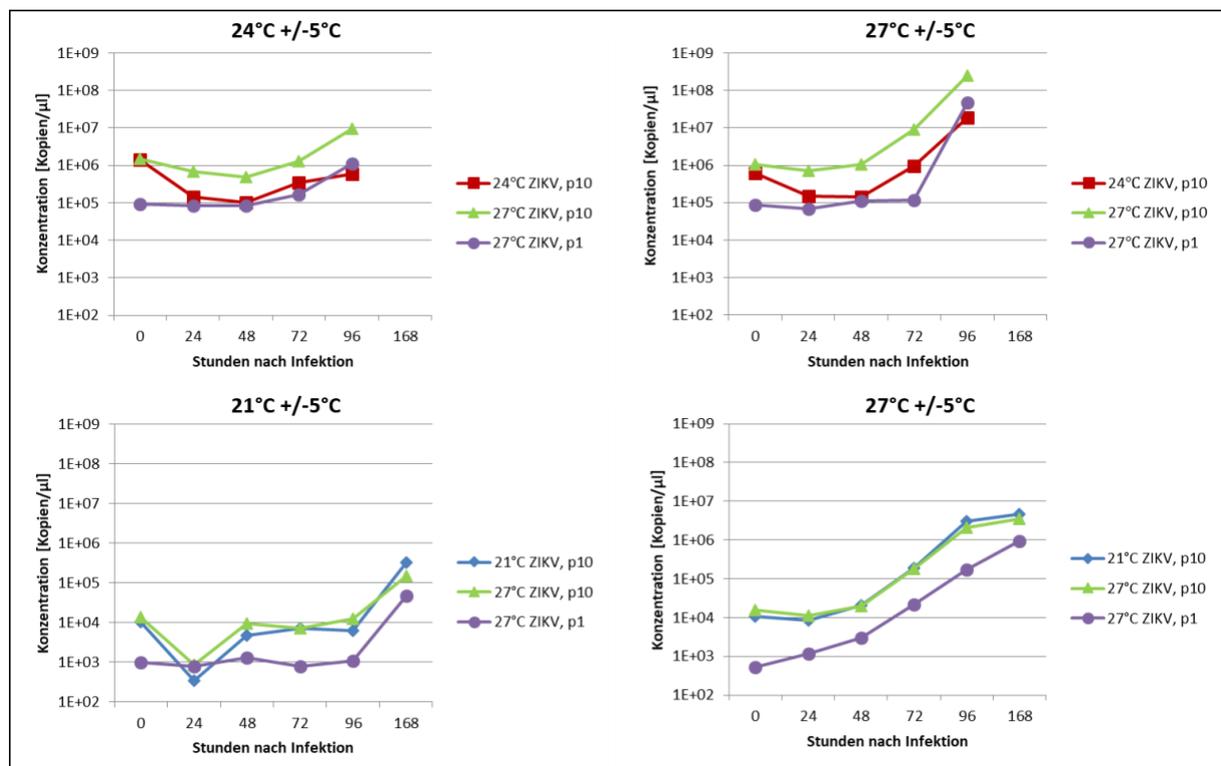
Weder die konzentrierten Lösungen der adaptierten ZIK Viren noch WN Viren zeigten deutliche Unterschiede in der Wachstumskinetik auf Säugetierzellen (Abbildung 3). Die Viren scheinen durch die „Adaption“ in Stechmückenzellen ihre Infektiosität in Säugetierzellen nicht verloren zu haben.

#### 5.4 Wachstum der „adaptierten“ Viren in Zellkultur bei unterschiedlichen Temperaturen

Die Wachstumskinetiken der adaptierten Stocks im Vergleich zum Original wurden bei 21°C, 24°C und 27°C ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) auf Stechmückenzellen (C6/36 und U4.4 für ZIKV und Ct für WNV) durchgeführt.

### 5.4.1 ZIKV

Abbildung 4: Wachstumskurven von „adaptierten“ ZIKV in Stechmückenzellen.

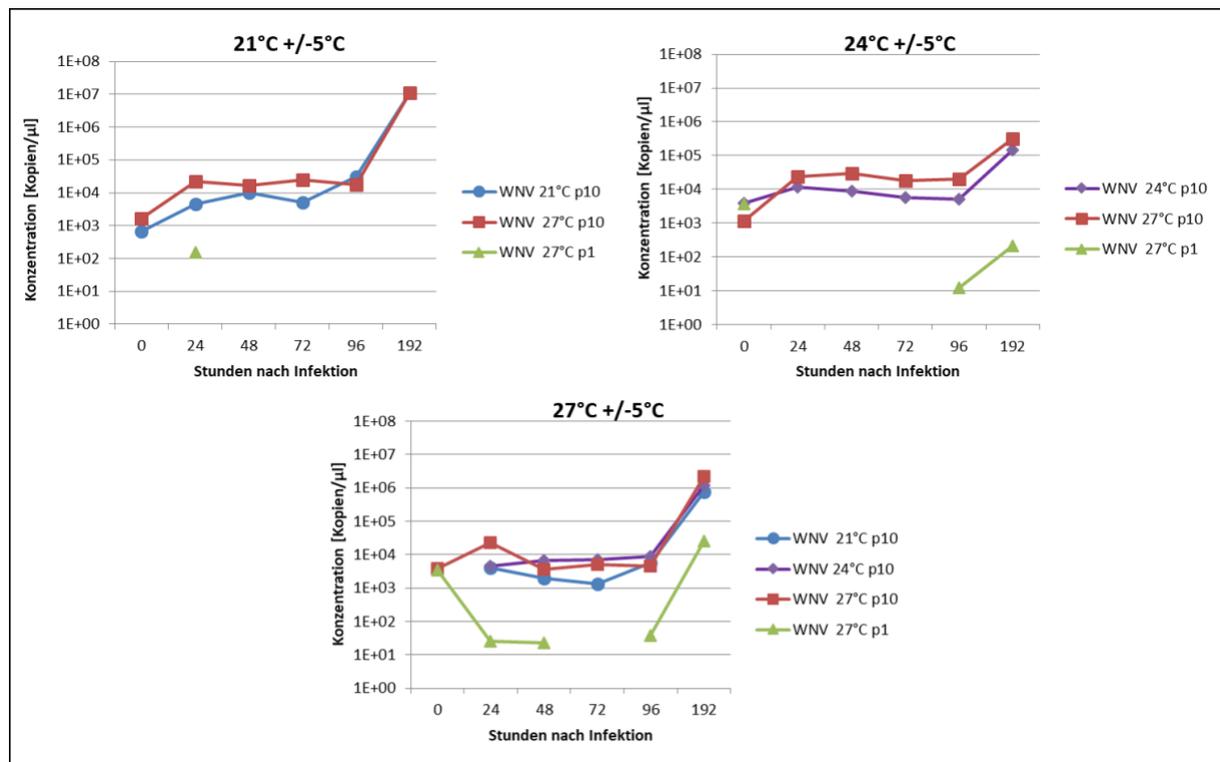


Stechmückenzellen (C6/36 von *Ae. albopictus*) wurden mit der gleichen Konzentration von unterschiedlichen „adaptierten“ ZIKV Stocks (21±5°C, 24±5°C oder 27°C, p10; nach Passage 10) oder dem Original-Stock (27°C, p1; nach Passage 1) als Kontrolle infiziert. Die infizierten Zellen wurden bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert, und virale RNA in den Überständen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Quelle: eigene Darstellung, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin.

Für ZIKV kann man sehen, dass die adaptierten Viren bei allen Temperaturen (21°C, 24°C und 27°C als Kontrolle) besser in den Stechmückenzellen wachsen als die nicht adaptierten Viren. Jedoch sieht man keine Verbesserung des Wachstums der „adaptierten“ Viren (Abbildung 4). Die Anpassung scheint also eher an die Stechmückenzellen als an die Temperatur stattgefunden zu haben.

## 5.4.2 WNV

Abbildung 5: Wachstumskurven von „adaptierten“ WNV in Stechmückenzellen.



Stechmückenzellen (Ct von *Cx. tarsalis*) wurden mit der gleichen Konzentration von unterschiedlichen „adaptierten“ WNV Stocks (21, 24 oder 27°C, p10; nach Passage 10) oder dem Original-Stock (27°C, p1; nach Passage 1) als Kontrolle infiziert. Die infizierten Zellen wurden bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert und virale RNA in den Überständen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Quelle: eigene Darstellung, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin.

Wie schon für ZIKV dargestellt, scheinen auch die adaptierten WN-Viren bei allen Temperaturen (21°C, 24°C und als Kontrolle 27°C) besser in den Stechmückenzellen zu replizieren als das Original-Virus. Die Anpassung ist bei WNV sogar noch deutlicher, da hier das Original-Virus gerade bei den niedrigen Temperaturen sehr viel schlechter repliziert als die passagierten Viren (Abbildung 5). Jedoch sieht man wieder keine Verbesserung im Wachstum der „adaptierten“ Viren im Vergleich zu dem Kontroll-Virus, welches bei 27°C passagiert wurde. Für ZIKV und WNV kann man sehen, dass die Viren sich an die Stechmückenzellen angepasst haben, aber nicht an eine niedrigere Temperatur. Im Vergleich hierzu sah man keine Unterschiede im Wachstum der passagierten Viren und des Original Virus in Säugetierzellen. Dies lässt darauf schließen, dass die Anpassung der passagierten Viren spezifisch ist für das Wachstum in Stechmückenzellen und nicht in Säugetierzellen.

## 5.5 Vektorkompetenz der Stechmücken für „adaptierte“ Viren

Es konnten keine Vektorkompetenzstudien mit den „adaptierten“ Viren in Stechmücken durchgeführt werden.

### 5.5.1 ZIKV

Die an 21°C adaptierten ZIK-Viren wurden für einen Pilotversuch ausgewählt, mit dem Ziel Vektorkompetenzstudien durchzuführen. Hierfür musste zunächst eine konzentrierte Virus-

Lösung mit ausreichend hohem Titer angezogen werden (mind.  $10^7$  pfu/mL). Unter Verwendung von sechs verschiedenen Säugetierzellen (Vero ATTC, Vero 81, Vero FR, BHK-J, PS, A549Npro) gelang es nicht, die Viren erfolgreich in ausreichender Menge zu propagieren. Auf einigen Zelllinien konnte kein Wachstum beobachtet werden, auf anderen nur ein geringes Wachstum mit sehr niedrigen Virustitern.

### **5.5.2 WNV**

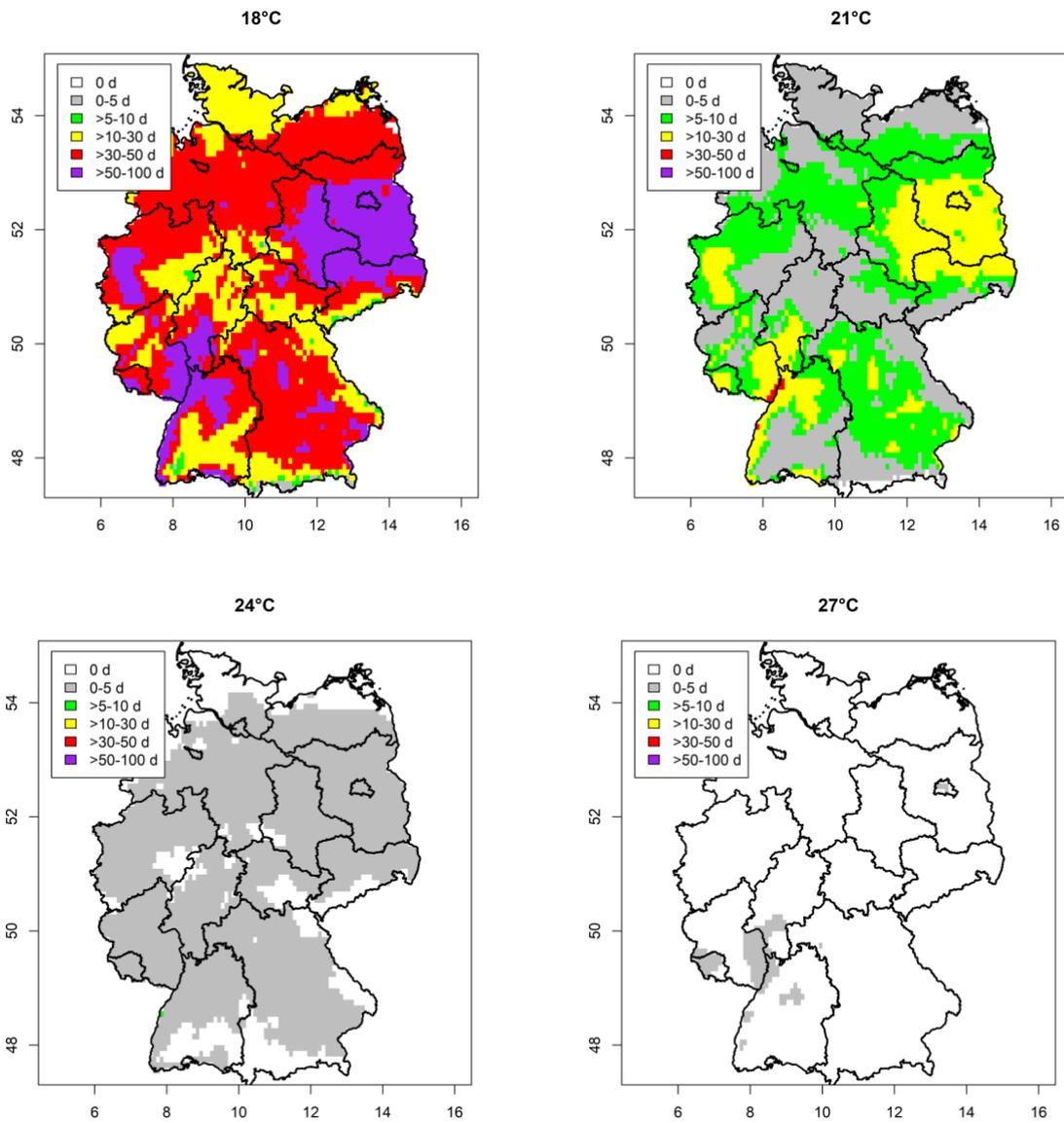
Es wurden keine Vektorkompetenzversuche mit WNV durchgeführt, da die Wachstumskurven zusammen mit der Mutationsanalyse nicht darauf schließen lassen, dass die Temperaturadaption der Viren erfolgreich war.

## 6 Erstellung von deutschlandweiten Risikokarten für die Übertragung der ausgewählten Viren

### 6.1 Karten der Temperaturbedingungen und Vektorverbreitung

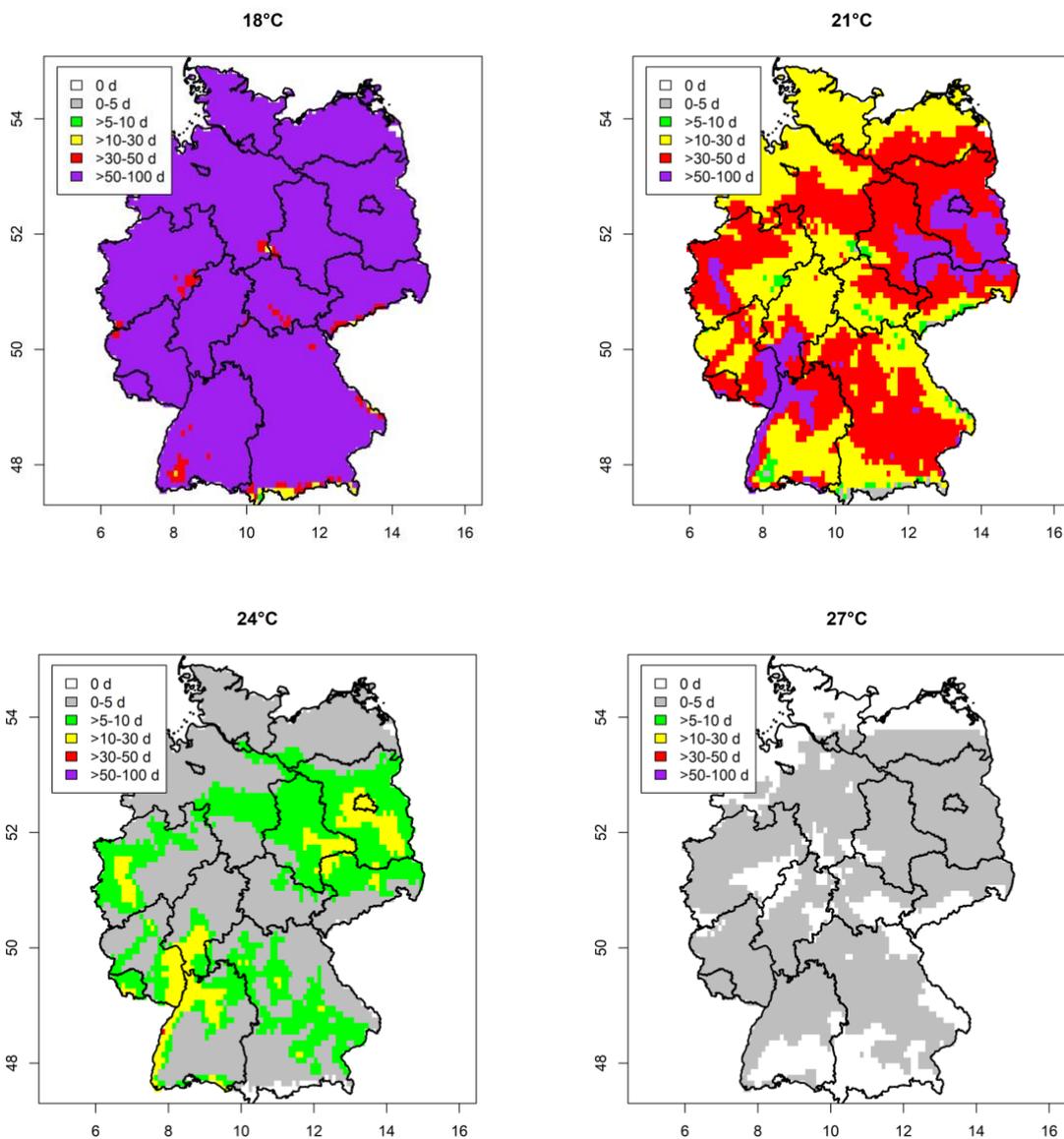
Das Risiko einer Virusübertragung durch Stechmücken ist neben der Einschleppung des Virus von zwei Bedingungen abhängig: 1) Vorhandensein eines kompetenten Vektors und 2) geeignete Temperaturbedingungen (Abbildung 6, Abbildung 7). Daher wurden zur Erstellung lokaler Risikokarten die Verbreitungskarten der Vektorarten mit den temperaturabhängigen Vektorkompetenzexperimenten kombiniert. Zur lokalen Bewertung des Risikos einer Übertragung des Virus auf den Menschen ist darüber hinaus die Bevölkerungsdichte entscheidend. Diese Risikoabschätzung wurde für Stechmücken-Virus-Kombinationen durchgeführt, die in den Vektorkompetenzstudien eine mittlere oder hohe TE aufwiesen. Eine TE zwischen 15% und 30% wurde als mittel und eine TE über 30% als hoch eingestuft. Entsprechende TEs konnten für ZIKV bei Versuchen mit *Ae. albopictus* und *Ae. detritus* und für CHIKV bei Versuchen mit *Ae. albopictus* and *Ae. sticticus* beobachtet werden. Für diese beiden Viren und drei Arten wurden entsprechende Verbreitungs- und Risikokarten erstellt.

**Abbildung 6: Mittlere Anzahl der Tage pro Jahr mit einer mittleren Tagestemperatur von 18°C, 21°C, 24°C bzw. 27°C nach 14 aufeinander folgenden Tagen der jeweiligen Temperatur (= Inkubationszeit in Stechmücke) (Zeitraum 1999-2019).**



Quelle: eigene Darstellung, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin.

**Abbildung 7: Mittlere Anzahl der Tage pro Jahr mit einer mittleren Tagestemperatur von 18°C, 21°C 24°C bzw. 27°C nach 14 aufeinander folgenden Tagen der jeweiligen Temperatur (= Inkubationszeit in Stechmücke) (Zukunfts-Szenario für 2100 mit +2,6°C).**



Quelle: eigene Darstellung, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin.

Die Vektorkompetenzstudien mit *Ae. albopictus* und CHIKV zeigten keine Temperaturabhängigkeit und eine Transmission bei allen untersuchten Temperaturen (15°-24°C, 14 dpi). Es scheint einen leichten Trend zu geben, dass die Übertragungsraten mit sinkenden Temperaturen steigen, was wahrscheinlich an dem herunterregulierten Immunsystem von *Ae. albopictus* liegt. Die Unterschiede waren aber nicht so groß, dass ein biologischer Effekt auf das Transmissionsrisiko erwartet werden kann. Dies bedeutet, dass vornehmlich die Verbreitung der Vektorart und nicht die lokalen Temperaturbedingungen der limitierende Faktor für die Übertragung von CHIKV sind. Die Ergebnisse wurden mit den europäischen Wetterdaten und der aktuellen Verbreitung der Spezies kombiniert und eine Risikokarte für die Transmission von CHIKV in Europa erstellt (Heitmann et al. 2018). Mit einem Blick auf Deutschland sind besonders der Oberrheingraben und zentrale Bereiche im Osten

Deutschlands temperaturbegünstigte Gebiete, die eine Etablierung der Asiatischen Tigermücke (*Ae. albopictus*) erlauben würden und somit ein potenzielles Verbreitungsgebiet darstellen

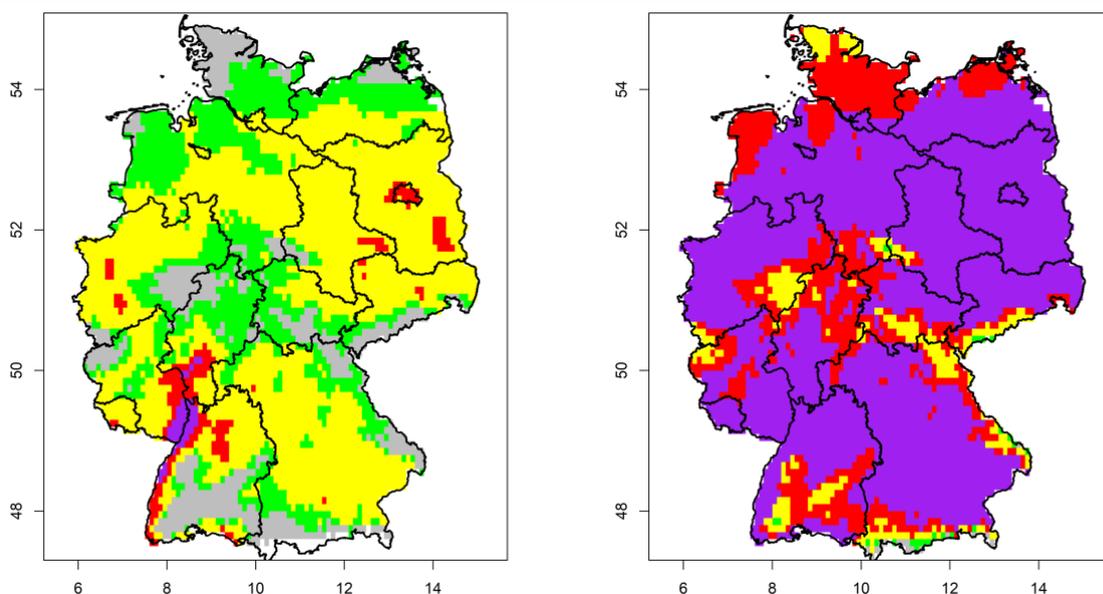
(Abbildung 8). Im Oberrheingraben lässt sich schon jetzt eine Vielzahl etablierter Populationen der exotischen Stechmückenart beobachten. Mit steigenden Temperaturen im Zuge der Klimaerwärmung (hier für das Zukunfts-Szenario für 2100 mit +2,6°C dargestellt, konservativste Szenario bezüglich der zu erwartbaren Klimaerwärmung unter der strengsten Klimapolitik (van Vuuren et al. 2011)) und anhaltender Einschleppung aus den etablierten Populationen aus Südeuropa, ist eine weitere Verbreitung der Art in Deutschland zu erwarten. Die klimatischen Bedingungen in größeren Teilen Deutschlands werden eine Etablierung der Art und somit eine Übertragung von CHIKV erlauben

(Abbildung 8). Dies stellt sich für ZIKV anders da. *Ae. albopictus* kann das Virus nur bei hohen Temperaturen (27°C) übertragen, wodurch es aktuell kein hohes Transmissionsrisiko gibt (Abbildung 6), aber auch das zukünftige Transmissionsrisiko als gering zu bewerten ist (Abbildung 7).

Bei *Ae. sticticus* wurden höhere Transmissionsraten für CHIKV nur bei 24°C festgestellt. Diese Temperaturen findet man in Deutschland aktuell nur für kurze Zeiträume (Abbildung 6). Bei gleichzeitiger räumlich restriktiver Verbreitung in Überschwemmungsgebieten (Abbildung 9), würde diese Art derzeit keine wichtige Rolle als Vektor von CHIKV spielen. Mit steigenden Temperaturen würde eine lokale Übertragung von CHIKV durch *Ae. sticticus* wahrscheinlicher (Abbildung 7). Durch die starke ökologische Bindung der Art an Überschwemmungsgebiete ist im Zuge der Klimaveränderung zunächst keine Veränderung des Verbreitungsgebietes zu erwarten.

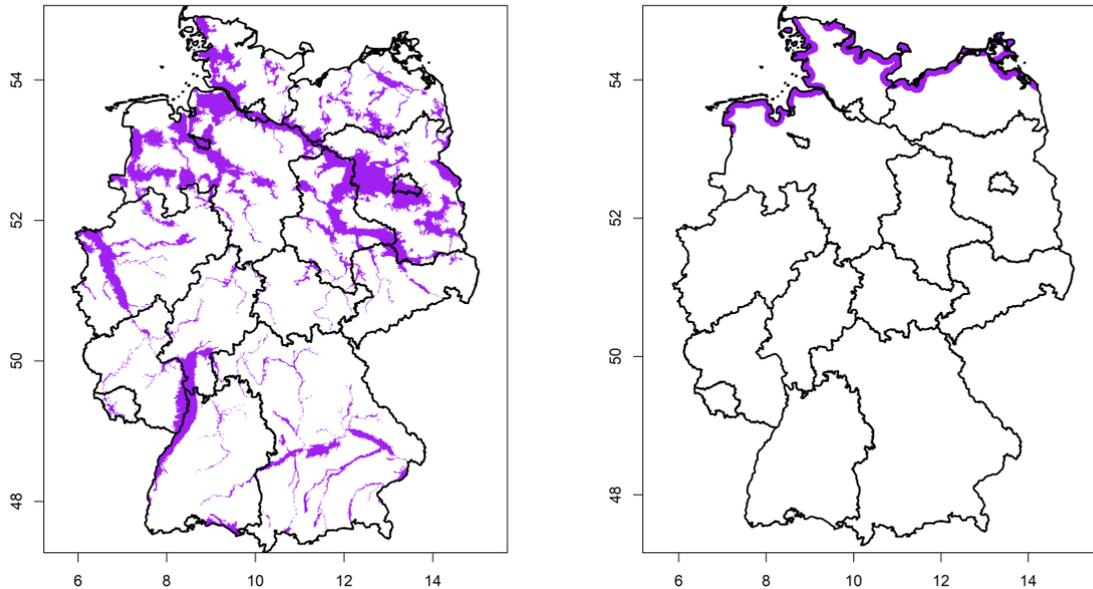
*Aedes detritus* zeigte eine hohe Transmission von ZIKV bei niedrigen Temperaturen von 21°C. Eine Temperatur die aktuell auch in Deutschland über längere Zeiträume vorkommt (Abbildung 6). Die Art ist als salzwasserliebende Art jedoch räumlich sehr stark auf den Küstenraum beschränkt (Abbildung 9). Durch die starke ökologische Bindung der Art an Salzwassergebiete ist im Zuge der Klimaveränderung zunächst keine Veränderung des Verbreitungsgebietes zu erwarten.

**Abbildung 8: Potenzielles Verbreitungsgebiet von *Aedes albopictus* in Deutschland.**



links: aktuelles Verbreitungsgebiet, rechts: zukünftiges Verbreitungsgebiet; violett: sehr hohe Vorkommenswahrscheinlichkeit, rot: hohe Vorkommenswahrscheinlichkeit, gelb: mittlere Vorkommenswahrscheinlichkeit, grün: niedrige Vorkommenswahrscheinlichkeit, grau: keine Vorkommenswahrscheinlichkeit; Quelle: eigene Darstellung, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin.

**Abbildung 9: Potenzielles Verbreitungsgebiet von *Aedes sticticus* und *Aedes detritus* in Deutschland.**



*Aedes sticticus* (links) und *Aedes detritus* (rechts); violett: sehr hohe Vorkommenswahrscheinlichkeit

## 6.2 Risikokarten für das Virusübertragungsrisiko

Eine Kombination des temperaturabhängigen Transmissionsrisikos für CHIKV und ZIKV mit der Vorkommenswahrscheinlichkeit der Vektoren wurde mit Hilfe einer Risikomatrix bestimmt (Abbildung 10). Gebiete mit einer hohen Vorkommenswahrscheinlichkeit für den Vektor bei gleichzeitig günstigen Temperaturbedingungen (=Transmissionsrisiko) haben dabei ein hohes Risiko der Virusübertragung. Gebiete mit niedriger Vorkommenswahrscheinlichkeit für den Vektor bei gleichzeitig niedrigen Transmissionsrisiko auf Grundlage der vorherrschenden Temperaturen haben entsprechend ein niedriges Risiko.

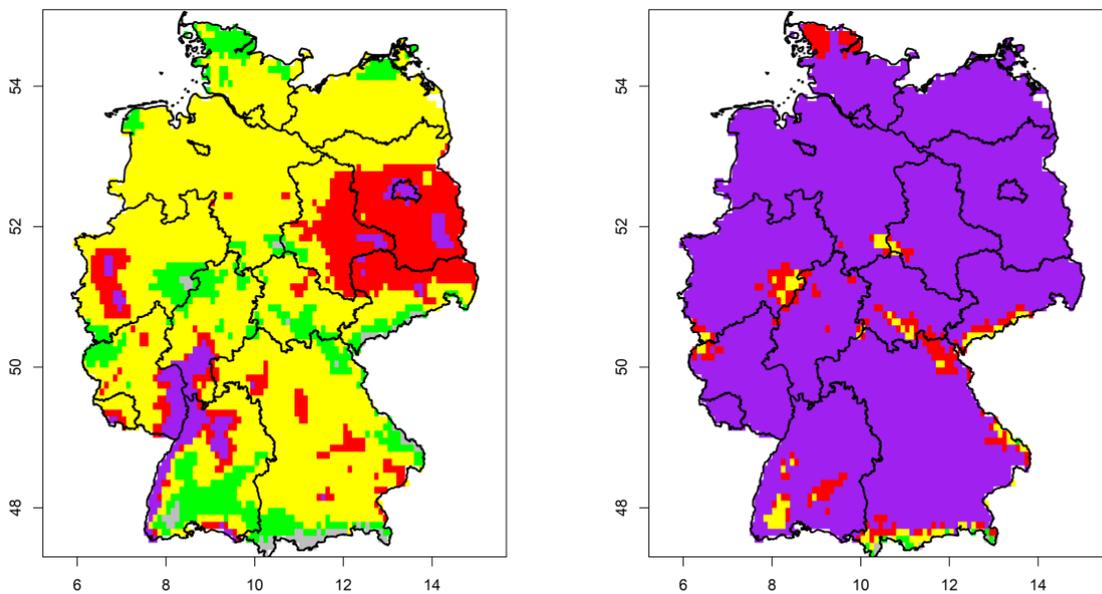
Risikokarten für das Transmissionsrisiko von CHIKV und ZIKV durch *Ae. albopictus* (CHIKV, ZIKV), *Ae. sticticus* (CHIKV) und *Ae. detritus* (ZIKV) in Deutschland wurden erstellt (Abbildung 11). Für CHIKV gibt es durch die nicht vorhandene Temperaturabhängigkeit der Transmission bei *Ae. albopictus* ein hohes Risiko in den Regionen in denen diese Art sich aktuell potenziell etablieren kann: Oberrheingraben und zentrale Bereiche im Osten Deutschlands. Durch die räumlich lokal stark begrenzte Verbreitung von *Ae. sticticus* und der gleichzeitigen höheren Transmissionrate bei höheren Temperaturen von 24°C könnte diese Art wahrscheinlich nur im Zuge der Klimaerwärmung eine Rolle als Überträger von CHIKV in Deutschland spielen. Mit zu erwartender weiterer Ausbreitung von *Ae. albopictus* muss mit einem Anstieg des Übertragungsrisikos für CHIKV gerechnet werden. Für ZIKV dagegen gibt es ein niedriges Risiko der Übertragung, da *Ae. albopictus* nur bei tropischen Temperaturen hohe TEs aufweist (Abbildung 12). Auch hier muss bei steigenden Temperaturen mit einem Anstieg des

Übertragungsrisikos gerechnet werden, wenn sich *Ae. albopictus* weiter ausbreitet. Das Risiko ist jedoch nicht so hoch wie für CHIKV. *Ae. detritus* zeigt eine höhere TE für ZIKV, aber die Art ist nur sehr lokal im Küstengebiet verbreitet (Abbildung 12), was sich durch ansteigende Temperaturen wahrscheinlich nicht ändern wird.

**Abbildung 10: Risikomatrix unter Berücksichtigung des Transmissionsrisikos und der Vektorverbreitung.**

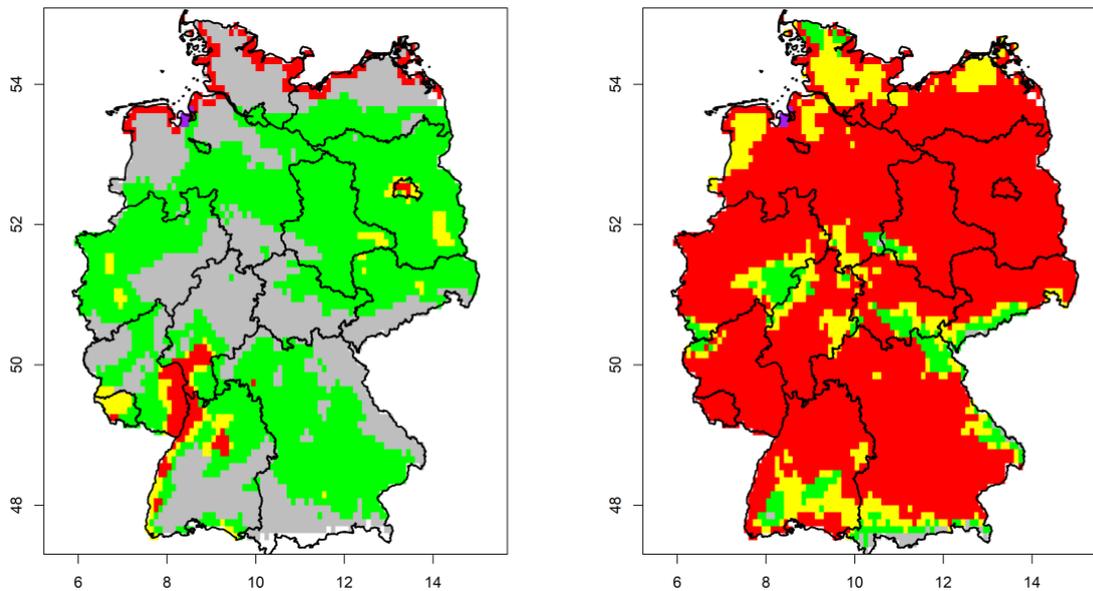
Vorkommenswahrscheinlichkeit/ Transmissionrisiko	low	medium	high	very high
low	low	low	medium	medium
medium	low	medium	medium	high
high	medium	medium	high	high
very high	medium	high	high	very high

**Abbildung 11: Risikokarten für das aktuelle und zukünftige Transmissionsrisiko von CHIKV in Deutschland auf Grundlage der Risikomatrix in Abbildung 10.**



links: aktuelles Transmissionsrisiko, rechts: zukünftiges Transmissionsrisiko; violett: sehr hohes Risiko, rot: hohes Risiko, gelb: mittleres Risiko, grün: niedriges Risiko, grau: kein Risiko; Quelle: eigene Darstellung, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin.

**Abbildung 12: Risikokarten für das aktuelle und zukünftige Transmissionsrisiko von ZIKV in Deutschland auf Grundlage der Risikomatrix in Abbildung 10.**



links: aktuelles Transmissionsrisiko, rechts: zukünftiges Transmissionsrisiko; violett: sehr hohes Risiko, rot: hohes Risiko, gelb: mittleres Risiko, grün: niedriges Risiko, grau: kein Risiko; Quelle: eigene Darstellung, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin.

### 6.3 Finale Risikokarten

Die Kombination von Risikokarten für das Übertragungsrisiko mit der Bevölkerungsdichte (Abbildung 13) erlauben es mit Hilfe der Risikomatrix (Abbildung 14) finale Risikokarten zu erstellen (Abbildung 15, Abbildung 16). Dabei wurden das Risiko für eine ZIKV und CHIKV Übertragung danach klassifiziert, wieviel Menschen in den jeweiligen Gebieten leben, um potenzielle Fokusgebiete festzulegen, die z.B. für zukünftige Monitoring- oder Bekämpfungsmaßnahmen einbezogen werden sollten. Wie zuvor dargestellt besteht für CHIKV im Vergleich zu ZIKV ein deutlich höheres Transmissionsrisiko. Die Kombination von Temperatur, Verbreitung des Vektors und Bevölkerungsdichte führt jedoch für beide Viren aktuell und zukünftig zu einem erhöhten Risiko in Nordrhein-Westfalen, dem Oberrheingebiet und dem zentralen Ostdeutschland (Abbildung 15, Abbildung 16), die als Hauptrisikogebiete zukünftig in den Fokus genommen werden sollten.

Abbildung 13: Bevölkerungsdichtekarte.

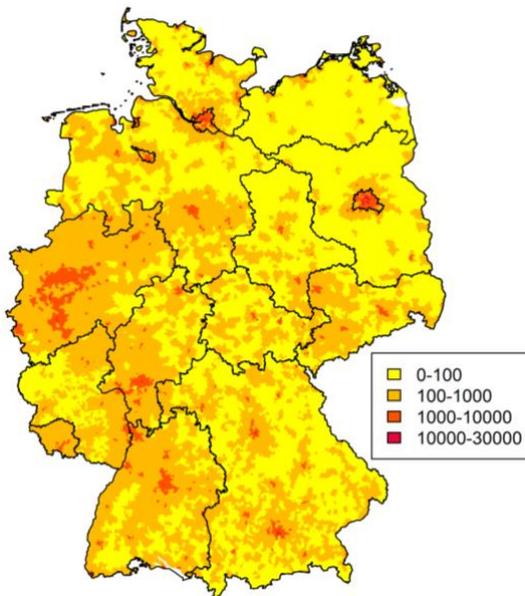
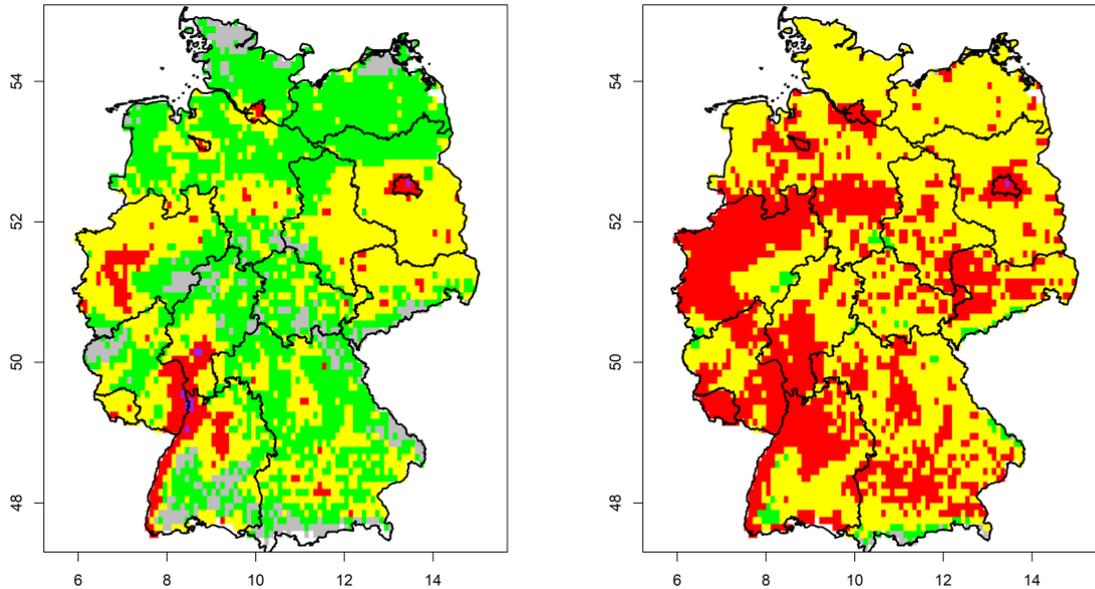


Abbildung 14: Risikomatrix der finalen Risikokarten unter Berücksichtigung des Transmissionsrisikos und der Bevölkerungsdichte.

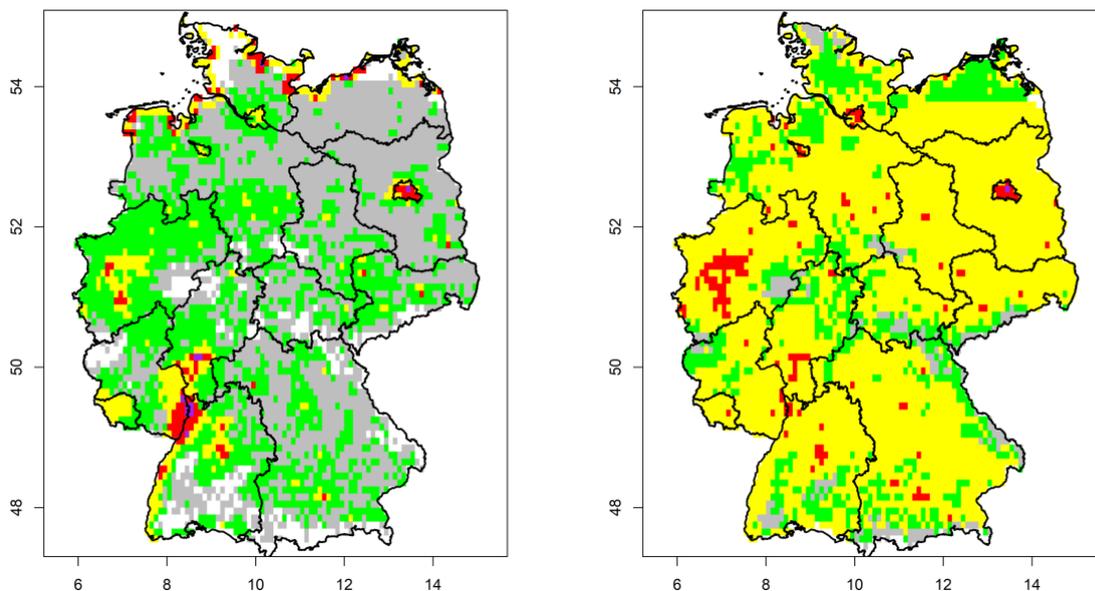
Bevölkerungsdichte/ Transmissionrisiko	low	medium	high	very high
0-100	low	low	medium	medium
100-1000	low	medium	medium	high
1000-10000	medium	medium	high	high
10000-30000	medium	high	high	very high

**Abbildung 15: Finale Risikokarten für das aktuelle Übertragungsrisiko von CHIKV in Deutschland auf Grundlage des Transmissionsrisikos (Abbildung 11) und der Bevölkerungsdichte (Abbildung 13).**



links: aktuelles Risikokarte, rechts: zukünftiges Risikokarte; violett: sehr hohes Risiko, rot: hohes Risiko, gelb: mittleres Risiko, grün: niedriges Risiko, grau: kein Risiko; Quelle: eigene Darstellung, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin.

**Abbildung 16: Finale Risikokarten für das zukünftige Übertragungsrisiko von ZIKV in Deutschland auf Grundlage des Transmissionsrisikos (Abbildung 12) und der Bevölkerungsdichte (Abbildung 13).**



links: aktuelles Risikokarte, rechts: zukünftiges Risikokarte; violett: sehr hohes Risiko, rot: hohes Risiko, gelb: mittleres Risiko, grün: niedriges Risiko, grau: kein Risiko; Quelle: eigene Darstellung, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin.

Fazit: Unsere Arbeit hat gezeigt, dass sowohl exotische als auch einheimische Stechmückenarten in Deutschland aktuell und zukünftig eine Rolle als Überträger für CHIKV und ZIKV darstellen können. Aufgrund der niedrigeren Temperaturansprüche des Virus muss davon ausgegangen werden, dass CHIKV zukünftig das deutlich höhere Risiko in Deutschland darstellen wird. Ein wesentlicher Faktor für das zukünftige Risiko der autochthonen CHIKV-Übertragung wird die zukünftige Ausbreitung der Asiatischen Tigermücke sein, mit deren weiterer Ausbreitung im Zuge der Klimaerwärmung gerechnet werden muss.

## 7 Quellenverzeichnis

- Becker, N. *et al.* (2020): Mosquitoes: Identification, Ecology and Control (Third edition), Basel: Springer International Publishing.
- Carrington L. B. *et al.* (2013): Reduction of *Aedes aegypti* vector competence for dengue virus under large temperature fluctuations. In: The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2013, 88, S. 689-97
- Delisle, E. *et al.* (2015): Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. In: Eurosurveillance, 2015, 20.
- Driggers, R. W. *et al.* (2016): Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. In: The New England journal of medicine, 2016, 374, S. 2142–2151
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2017: Autochthonous transmission of chikungunya virus in mainland EU/EEA, 2007–present. ECDC, Stockholm. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/chikungunya-virus-disease/surveillance-threats-and-outbreaks/autochthonous>. Zugriffsdatum: 8.6.2022.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2019: Zika virus disease in Var department, France – 16 October 2019. Stockholm: ECDC; 2019. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-zika-virus-disease-var-department-france>. Zugriffsdatum: 8.6.2022
- Lühken, R. *et al.* (2020): Microsatellite typing of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations from Germany suggests regular introductions. In: Infection, Genetics and Evolution, 2020, 81, .
- Giron, S. *et al.* (2015): New occurrence of autochthonous cases of dengue fever in Southeast France, august September 2014. In: Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, 2015, 13–14, S. 217–223.
- Gjenero-Margan, I. *et al.* (2011): Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. Eurosurveillance, 2011, 16.
- Grandadam, M. *et al.* (2011): Chikungunya virus, southeastern France. In: Emerging Infectious Diseases, 2011, 17, S. 10–913.
- Heitmann, A. *et al.* (2017): Experimental transmission of Zika virus by mosquitoes from central Europe. In: Eurosurveillance, 2017, 22.
- Heitmann, A. *et al.* (2018): Experimental risk assessment for chikungunya virus transmission based on vector competence, distribution and temperature suitability in Europe. In: Eurosurveillance, 2018, 23.
- Hilton, L. *et al.* (2006): The NPro product of bovine viral diarrhoea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. In: Journal of Virology, 2006, 80, S. 11723–11732
- Huber, K. *et al.* (2014): *Aedes japonicus* (Diptera: Culicidae) from Germany have vector competence for Japan encephalitis virus but are refractory to infection with West Nile virus. In: Parasitology Research, 2017, 113, S. 3195–3199
- Jansen S. *et al.* (2019): *Culex torrentium*: A Potent Vector for the Transmission of West Nile Virus in Central Europe. In: Viruses, 2019, 11.
- La Ruche, G. *et al.* (2010): First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. In: Eurosurveillance, 2010, 15.
- Leggewie, M. *et al.* (2016): *Culex pipiens* and *Culex torrentium* populations from Central Europe are susceptible to West Nile virus infection. In: One Health , 2016, 2 S. 88-94.

- Lühken R. *et al.* (2017): Distribution of Usutu Virus in Germany and Its Effect on Breeding Bird Populations. In: Emerging Infectious Diseases, 2017, 23, S. 1994-2001.
- Lühken R. *et al.* (2020): Microsatellite typing of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations from Germany suggests regular introductions. In: Infection, Genetics and Evolution, 2020, 81.
- Marchand, E. *et al.* (2013): Autochthonous case of dengue in France, October 2013. In: Eurosurveillance, 18.
- Mordecai, E. A. *et al.* (2019): Thermal biology of mosquito-borne disease. In: Ecology letters, 2019, 22, S. 1690–1708
- Musso, D., Gubler D.J. (2016): Zika Virus. In: Clinical Microbiology Reviews, 2016, 29, S. 487-524.
- Schmidt-Chanasit, J. *et al.* (2010): Dengue virus infection in a traveller returning from Croatia to Germany. In: Eurosurveillance, 2010, 15.
- Rezza, G. *et al.* (2007): Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. In: Lancet, 2007, 370, S. 1840–1846.
- RKI. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2020, Berlin 2021
- Romero-Tejeda, A. und Capua, I. (2013): Virus-specific factors associated with zoonotic and pandemic potential. In: Influenza and other respiratory viruses, 2013, 7, S. 4–14.
- Rossini, G. *et al.* (2011): Phylogenetic analysis of West Nile virus isolates, Italy, 2008-2009. In: Emerging Infectious Diseases, 2011, 17, S. 903–906.
- Roundy, C. M. *et al.* (2017): Variation in *Aedes aegypti* Mosquito Competence for Zika Virus Transmission. In: Emerging Infectious Diseases, 2017, 23, S. 625–632.
- Rudolf, M. *et al.* (2013): First nationwide surveillance of *Culex pipiens* complex and *Culex torrentium* mosquitoes demonstrated the presence of *Culex pipiens* biotype *pipiens/molestus* hybrids in Germany. In: PLoS One, 2013, 8.
- Schmidt-Chanasit, J. *et al.* (2010): Dengue virus infection in a traveller returning from Croatia to Germany. In: Eurosurveillance, 2010, 15.
- Succo, T. *et al.* (2016): Autochthonous dengue outbreak in Nimes, south of France, July to September 2015. In: Eurosurveillance, 2016, 21.
- Van Vuuren, D.P. *et al.* (2011): The representative concentration pathways: an overview. In: Climatic Change, 2011, 5.
- Venturi, G. *et al.* (2016): An autochthonous case of Zika due to possible sexual transmission, Florence, Italy, 2014. In: Eurosurveillance, 2016, 21.
- Vilibic-Cavlek, T. *et al.* (2014): First evidence of simultaneous occurrence of West Nile virus and Usutu virus neuroinvasive disease in humans in Croatia during the 2013 outbreak. In: Infection, 2014 4, S. 689-95.
- Weaver, S. C. *et al.* (2020): Chikungunya Virus: Role of Vectors in Emergence from Enzootic Cycles. In: Annual Review of Entomology, 2020, 3, S. 313–332.
- Ziegler, U. *et al.* (2020): West Nile Virus Epidemic in Germany Triggered by Epizootic Emergence, 2019. In: Viruses, 2020,4, S. 448.
- Ziegler, U. *et al.* (2019): West Nile virus epizootic in Germany. In: Antiviral Research, 2018, 162, S. 39-43..