**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Bernhard-Nocht-Institut Hamburg
Prof. Dr. R. Horstmann (Vorstandsvorsitzender)

# Seroprevalence of Antibodies against Chikungunya, Dengue and Rift Valley Fever Viruses after Febrile Illness Outbreak, Madagascar

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Mirko Girmann
aus Hamburg

Hamburg 2013

**(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)**

**Angenommen von der**
**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 05.05.2014**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der**
**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. J. May**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. S. Polywka**

**~~Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in~~:**

# Seroprevalence of Antibodies against Chikungunya, Dengue, and Rift Valley Fever Viruses after Febrile Illness Outbreak, Madagascar

**Norbert G. Schwarz,[1] Mirko Girmann,[1] Njary Randriamampionona, Alexandra Bialonski, Deborah Maus, Anne Caroline Krefis, Christine Njarasoa, Jeanne Fleury Rajanalison, Herly Daniel Ramandrisoa, Maurice Lucien Randriarison, Jürgen May, Jonas Schmidt-Chanasit, and Raphael Rakotozandrindrainy**

In October 2009, two–3 months after an outbreak of a febrile disease with joint pain on the eastern coast of Madagascar, we assessed serologic markers for chikungunya virus (CHIKV), dengue virus (DENV), and Rift Valley fever virus (RVFV) in 1,244 pregnant women at 6 locations. In 2 eastern coast towns, IgG seroprevalence against CHIKV was 45% and 23%; IgM seroprevalence was 28% and 5%. IgG seroprevalence against DENV was 17% and 11%. No anti-DENV IgM was detected. At 4 locations, 450–1,300 m high, IgG seroprevalence against CHIKV was 0%–3%, suggesting CHIKV had not spread to higher inland-altitudes. Four women had IgG against RVFV, probably antibodies from a 2008 epidemic. Most (78%) women from coastal locations with CHIKV-specific IgG reported joint pain and stiffness; 21% reported no symptoms. CHIKV infection was significantly associated with high bodyweight. The outbreak was an isolated CHIKV epidemic without relevant DENV co-transmission.

In October 2009, the sentinel surveillance system for early outbreak detection in Madagascar (*1*) reported an increase of cases of fever with joint pain on the eastern coast. At the beginning of February 2010, chikungunya virus (CHIKV) infection was diagnosed in a patient from the Mananjary district. The International Federation of Red Cross and Red Crescent Societies reported 702 clinically diagnosed cases of chikungunya during February 9–February 15, 2010. Six hundred occurred in the coastal city of Mananjary, and 96 occurred in the small village of Irondro at the crossroads between the towns of Mananjary, Manakara, and Ifanadiana, indicating that the area was a focal point of the epidemic (Figure 1) (*2*).

Arthropod-borne viruses (arboviruses) such as CHIKV (*3*), dengue virus (DENV), and Rift Valley fever virus (RVFV) (*4*,*5*) are emerging pathogens in the southwestern Indian Ocean region. In 2005–2006, CHIKV caused outbreaks and epidemics on La Réunion, Mauritius, Mayotte, and the Seychelles (*6*), which caused considerable illness and death (*7*). Chikungunya appears to occur as an epidemic and an endemic disease in this region. The endemic disease affects mainly populations with high levels of IgG against CHIKV who live in rural areas in Africa (*8*). The epidemic disease occurs in Asia and the Indian Ocean region in populations in which herd immunity is weak, often in urban areas where *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes are the main transmission vectors. During epidemics, humans are the primary reservoirs. Monkeys, rodents, birds, and cattle have been identified as animal reservoirs (*9*–*11*). The onset of chikungunya epidemics is acute with high attack rates as seen in 2005–2006 on La Réunion (*12*). Concurrent epidemics of dengue and chikungunya have been reported from Asia (*13*) and Africa (*14*). In 2006, a combined outbreak of dengue fever and chikungunya fever occurred near the Madagascan city

Author affiliations: Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg, Germany (N.G. Schwarz, M. Girmann, A.C. Krefis, J. May); World Health Organization Collaborating Centre for Arbovirus and Haemorrhagic Fever Reference and Research, Hamburg (A. Bialonski, D. Maus, J. Schmidt-Chanasit); Université d'Antananarivo, Antananarivo, Madagascar (N. Randriamampionona, R. Rakotozandrindrainy); Hôpital d'Ambositra, Ambositra, Madagascar (C. Jnarasoa); Medecin Inspecteur de Tsiroanomandidy, Tsiroanomandidy, Madagascar (J.F. Rajanalison); Medecin Inspecteur de Moramanga, Moramanga, Madagascar (H.D. Ramandrisoa); and Centre de Santé de Base Urban de Mananjary,Mananjary, Madagascar (M.L. Randriarison)

DOI: http://dx.org/10.3201/eid1811.111036

[1]These authors contributed equally to this article.

of Toamasina (*15*), but the rest of the country remained unaffected by the epidemic. An increased number of RVFV infections was noticed in Madagascar during the rainy seasons of 2008 and 2009 with 476 (19 fatal) and 236 (7 fatal) suspected cases, respectively (*4*).

The sudden emergence of chikungunya in the Mananjary area indicated a lack of herd immunity in the affected population. The previous outbreak of CHIKV infection in Madagascar in 2006 in the Toamasina region occurred in conjunction with DENV infection. Because of the recent reports of RVFV infections in animals and humans, our investigation of the recent outbreak in Madagascar included assessment of serologic parameters against CHIKV, DENV, and RVFV.

Approximately 2–3 months after the peak and 1–2 months after the decline of the outbreak of chikungunya, we retrospectively assessed the serologic markers and reported clinical features of women who came for routine pregnancy follow-up visits at 6 geographic locations. By focusing on pregnant women, we could reduce the need to stratify for age and sex and thus minimize the fragmentation of data. The focus could then to be placed on 1) assessing a possible inward spread of the epidemic, 2) evaluating whether the epidemic was limited to CHIKV or due to a simultaneous occurrence of DENV or RVFV infections, and 3) detecting factors associated with an increased risk of CHIKV infection.

## Methods

The cooperative project of the University of Antananarivo and the Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine was carried out during May–July 2010. Overall, 1,244 pregnant women were included from 6 different sites (Figure 1). Investigations were conducted in 2 coastal cities: Mananjary, the suspected epicenter of the chikungunya epidemic in February, and Manakara. Inland study sites included Ifanadiana, located at the ascending road from the above-mentioned cities to the highlands, the 2 highland cities of Tsiroanomandidy and Ambositra, and Moramanga, a highland city between Antananarivo and Toamasina. The study sites were chosen to include the coastal cities where the suspected chikungunya outbreak was reported (Manajary and Manakara), a city lying at the main road leading to the outbreak region on a moderate elevation level of 466 m (Ifanadiana), and 3 arbitrarily chosen cities in the highlands (Moramanga, Tsiroanomandidy, and Ambositra). Pregnancy follow-up services were chosen for a population comprehensive enough to allow the collection of ≈200 samples within a week. All women attending the routine pregnancy follow-up services were included.

The study was approved by the "Comité d'ethique de la Vice Primature Chargée de la Santé Publique" and discussed with representatives of the World Health Organization (WHO) during a meeting at the WHO office in Antananarivo on April 23, 2010. The study was explained to every participant, and informed consent was either signed (or, in the case of illiteracy, a fingerprint was obtained), and signature of a witness was acquired. Data on the course of pregnancy were obtained from interviews and review of the pregnancy follow-up booklet. To assess symptoms of CHIKV infections, researchers questioned the participants regarding current symptoms, symptoms that occurred since the time of their last menorrhea, or symptoms they recalled from a recent confirmed or suspected CHIKV infection.

Figure 1. Madagascar (gray shading in inset), showing the main roads, the capital of Antananarivo (square), the harbor city of Toamasina (white circle), and the locations of the 6 study sites (black circles) from which serologic samples from pregnant women were screened for IgG against chikungunya virus, dengue virus, and Rift Valley fever virus. The altitudes of the locations are as follows: Mananjary and Manakar, coastal; Ifanadiana, 466 m; Moramanga, 920 m; Tsiroanomandidy, 860 m; Ambositra, 1,280 m; Toamasina, coastal; Irondro, 40 m; Antananarivo, 1,300 m.

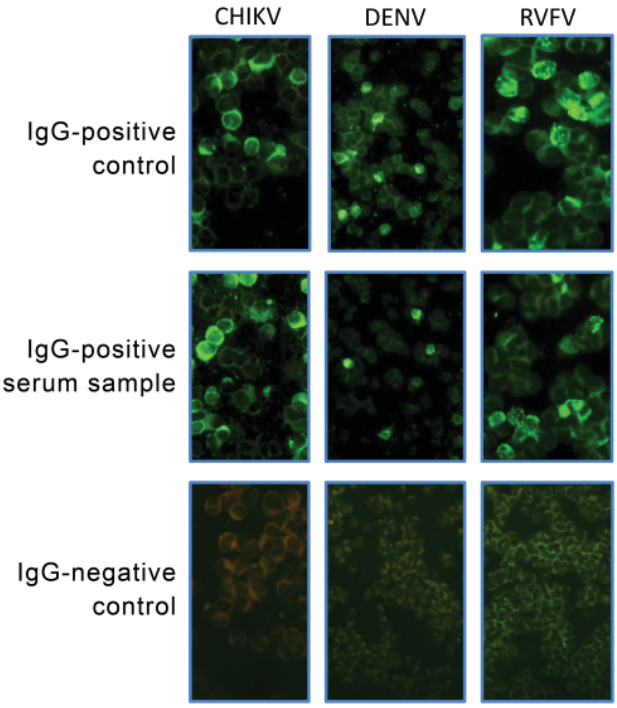



Figure 2. Images from immunofluorescence assays in Vero E6 cells for IgG against chikungunya virus (CHIKV), dengue virus (DENV), and Rift Valley fever virus (RVFV). Original magnification ×100 and 200. A color version of this figure is available online (wwnc.cdc.gov/EID/article/18/11/11-1036-F2.htm).

A venous blood sample collected into EDTA was taken for measurement of IgG against CHIKV, DENV, and RVFV. To detect acute CHIKV or DENV infections, we measured levels of IgM against CHIKV and DENV. Immunofluorescence assays (IFAs) for CHIKV, DENV, and RVFV were performed with virus-infected Vero E6 cells as described (*16*). In brief, Vero cells were spread onto slides, air dried, and fixed in acetone. Plasma samples were serially diluted in phosphate-buffered saline, starting with an initial dilution of 1:10, added to the cells, and incubated for 90 minutes at 37°C. After slides were washed with phosphate-buffered saline, they were incubated with fluorescein isothiocyanate–labeled rabbit antihuman IgG and IgM (SIFIN, Berlin, Germany) at 37°C for 25 minutes (Figures 2,3). IgG or IgM titers >100 were considered positive.

The serologic controls used for the IFA were the standard routine controls of the WHO Collaborating Centre for Arbovirus and Haemorrhagic Fever Reference and Research in Hamburg, Germany. Moreover, the controls used in this serologic survey were used as external quality assessment samples by the WHO Collaborating Centre for Quality Assurance and Standardization in Laboratory Medicine, Berlin, Germany. The sensitivity and specificity of the IFAs were demonstrated to be 100%, according to results of external quality assessments organized by the European Network for Diagnostics of Imported Viral Diseases (*17*). The DENV nonstructural protein 1 (NS1) antigen ELISA was performed according to the instructions of the manufacturer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The DENV NS1 antigen is a marker for DENV antigen circulation and thus detects acute infections up to day 21 after onset of symptoms.

The following retrospectively self-reported symptoms were assessed: fever, joint pain, and stiffness, skin symptoms and rashes, hip vibrations and pain, conjunctivitis, and stooped posture. For the 2 coastal locations where seroprevalence of CHIKV was highest, we analyzed potential risk factors for CHIKV infection, taking into account patient's age, mosquito protective measures (bednet, fan, repellent, air conditioner), and because our study population consisted of pregnant women, we also considered pregnancy-related factors such as parity, weight, and trimester of pregnancy.

Statistical analysis was performed by using STATA version 10 (www.stata.com). The risk factor analysis was done by using univariable and multivariable logistic regressions. If the odds ratios suggested a trend over

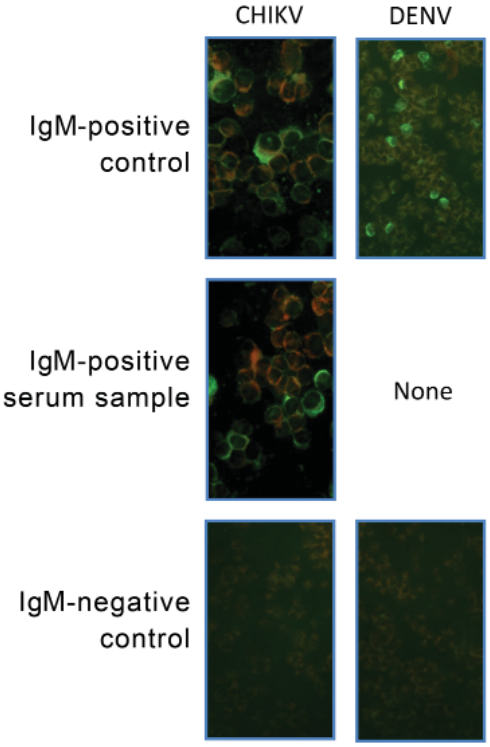



Figure 3. Images of immunofluorescence assays in Vero E6 cells for IgM against chikungunya virus (CHIKV) and dengue virus (DENV). For each of the viruses, a positive control, an example of a positive serum sample (if available), and a negative control are shown. Original magnification ×100 and 200. A color version of this figure is available online (wwnc.cdc.gov/EID/article/18/11/11-1036-F3.htm).

several categories, a nonparametric test for trend was conducted in the univariable analysis. For multivariable models, a Mantel-Haenszel test for trend, adjusted for the other variables in the model, was performed.

## Results

A total of 1,244 women from 6 locations in Madagascar were included in the study. All locations, when data were presented graphically, showed a right-skewed age distribution. The median age was 25 years (range 12–50 years). The median age of women from the 2 coastal locations (Mananjary and Manakara) was not significantly different from that of women from higher altitudes (p = 0.95, by Wilcoxon rank sum test). No relevant difference was found regarding the proportion of primiparas by location (28.4% in the highlands compared with 27.4% at the coast, p = 0.70, by $\chi^2$ test). None of the participants had an air conditioner at home; 3 women who lived on the coast reported using a fan. Two women who lived in the highlands reported using mosquito repellents. The only noteworthy mosquito protective measure used frequently was bednets (70.3%). Bednet use was significantly higher for women from the coastal cities of Mananjary (88.2%) and Manakara (90.8%) than for those living in the highland cities of Moramanga (65.7%), Ambositra (21.5%), and Tsiroanomandidy (56.7%). Of those from Ifanadiana, a coastal city at 450-m altitude, 94% used bednets.

Table 1 shows the levels of IgG against CHIKV, DENV, and RVFV, and the results of the IFAs that measured IgM against CHIKV and DENV. IgM against CHIKV was only detected in samples from Mananjary and Manakara taken ≈2–4 months after the peak of the epidemic. Although 27.5% of the samples from Mananjary and 5.2% of the samples from Manakara were positive for IgM against CHIKV, IgM against CHIKV was not detected in samples from other noncoastal locations. IgM against DENV and DENV NS1 antigen, indicators of DENV viremia, were not detected in any location.

A total of 154 of the 1,244 pregnant women (12.4%) were positive for IgG against CHIKV, and 116 of them (75.3%) had reported a history of symptoms of CHIKV infection since their last menorrhea. The highest rates of IgG against CHIKV (Mananjary 44.6%, Manakara 22.7%) and IgM against DENV (Mananjary 17.4%, Manakara 10.8%) were found in the 2 coastal cities (Figure 1; Table 1). IgG against CHIKV and DENV were found in 7.2% and 2.4% in Mananjary and Manakara, respectively. Differences in seroprevalences at the other locations, all at higher altitudes, were negligible, apart from the high frequency of IgG against DENV in Moramanga (11.7%) and Tsiroanomandidy (3.9%). Among persons with IgG against CHIKV, the proportion of women who reported a history of symptoms related to CHIKV infection during the recent outbreak was the same in Mananjary and Manakara (79%). None of the women interviewed from Moramanga reported a history of recent symptoms, even if they had IgG against CHIKV or DENV.

According to the results, only persons with IgG against CHIKV from Mananjary and Manakara could be confidently assigned to the 2009–2010 outbreak. Therefore, reported symptoms and analysis of risk factors for CHIKV infection was confined to these 2 locations (Tables 2, 3). Risk for previous CHIKV infection increased with body weight (Table 2). This association persisted after adjusting for parity, bednet use, and age (Table 3) and after additionally adjusting for the trimester of pregnancy (Table 3).

## Discussion

In contrast to the outbreak in the Toamasina area of Madagascar in 2006, the outbreak investigated here appears to be exclusively caused by CHIKV infections without concomitant DENV infection. Although one third of the participants in coastal cities at the epicenter of the outbreak were infected with CHIKV, the epidemic did not spread to higher altitudes and further inland. The chikungunya epidemic curve reached its peak in Mananjary in February and abated in March 2010; in Manakara, the epidemic occurred ≈1 month later. The duration of the epidemic roughly corresponds to the rainy season in Madagascar from November to April. Anti-CHIKV IgG was detected in all samples positive for anti-CHIKV IgM, and we assumed that the outbreak had ended before the investigation

Table 1. Measurement of antibodies against CHIKV, DENV, and RVFV in samples from pregnant women in Madagascar, May–July 2010*

| | | | | No. (%) women with | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Location | Altitude, m | Month | Total no. women | IgG against CHIKV | IgG against DENV | IgG against RVFV | IgG against CHIKV/DENV† | IgM against CHIKV‡ |
| Mananjary | 0 (coastal) | May | 195 | 87 (44.6) | 34 (17.4) | 2 (1) | 14 (7.2) | 53 (27.5) |
| Manakara | 0 (coastal) | Jun | 251 | 57 (22.7) | 27(10.8) | 1 (0.4) | 6 (2.4) | 13 (5.2) |
| Ifanadiana | 466 | Jun | 197 | 2 (1.0) | 4(2.0) | 0 | 0 | 0 |
| Moramanga | 920 | Jul | 198 | 6 (3.1) | 23(11.7) | 0 | 1 (0.5) | 0 |
| Tsiroanomandidy | 860 | Jul | 203 | 0 | 8 (3.9) | 1 (0.5) | 0 | 0 |
| Ambositra | 1,280 | May | 175‡ | 2 (1.1) | 1(0.6) | 0 | 1 (0.6) | 0 |

*CHIKV, chikungunya virus; DENV, dengue virus; RVFV, Rift Valley fever virus.
†Samples that were positive for IgG against both CHIKV and DENV.
‡For 25 women from Ambositra, no serologic samples were taken. No samples were positive for IgM against DENV.

Table 2. Signs and symptoms of pregnant women with IgG against CHIKV from Mananjary and Manakara, Madagascar, May–July 2010*

| Symptom/sign | No. (%) women with IgG against CHIKV, n = 144 | No. (%) women with IgG against DENV, n = 61 |
|---|---|---|
| Fever | 107 (74) | 21 (34) |
| Joint pain and stiffness | 113 (78) | 22 (36) |
| Skin symptoms or rashes | 87 (60) | 19 (31) |
| Hip vibrations and pain | 84 (58) | 20 (33) |
| Stooped posture† | 77 (53) | 18 (30) |
| Conjunctivitis | 27 (18) | 9 (15) |
| Asymptomatic | 30 (21) | 39 (64) |

*CHIKV, chikungunya virus; DENV, dengue virus.
†Stooped posture refers to the posture that persons affected by strong joint and muscle pains adopt to relieve pain. The word "chikungunya" comes from the Makonde language spoken in southeast Tanzania and means "the one who bends up and curls like a drying leaf."

described here was started. In the noncoastal locations, all samples were negative for IgM against CHIKV, which suggests that the epidemic was constrained to the coast.

By focusing on pregnant women, we achieved a relatively homogenous study population, which facilitated the comparison of differences between study sites by reducing differences between persons (e.g., age or sex) and overfragmentation of the data. In addition to DENV, the presence of RVFV was assessed because this virus has been recently reported in Madagascar (*4*,*18*). In 22 persons, IgG against CHIKV and IgG against DENV were detected. The major mosquito vectors of both viruses are equally susceptible to CHIKV and DENV, with simultaneous transmission being confirmed in experimental settings (*19*,*20*). Although a considerable number of the samples from Mananjary (17.4%) and from Manakara (10.8%) were positive for IgG against DENV, none was positive for DENV IgM or DENV NS1 antigen, which suggests past DENV infections, independent of the recent chikungunya epidemic.

A limitation of the study is the possibility that some women may have had prior CHIKV infections before the outbreak investigated in this study. A CHIKV outbreak was reported in the Toamasina region in 2006 (*15*). However, it seems unlikely that a relevant proportion of the resident population of the Mananjary region acquired CHIKV immunity during the Toamasina outbreak because this region is 400 km distant from Mananjary, and no tarred road exists along the coast. The elevated seroprevalance of IgG and IgM against CHIKV in the coastal city of Manakara, which lies 100 km south of Mananjary, suggests that the outbreak spread southwards along the coast.

The International Federation of Red Cross and Red Crescent Societies reported that the town of Irondo, where the inbound roads from Mananjary and Manakara meet, was also affected by the outbreak (*2*).The town is situated 30 km from the coastline at an altitude of ≈40 m. Although an altitude of 400–500 m does not avert mosquito survival, the low seroprevalence in Ifanadiana (altitude 466 m, 70 km inland) provides evidence against an upward and inbound spread of the epidemic. The long travel distance between Irondro and Ifanadiana, with serpentine roads and long uninhabited stretches between small settlements, may have interrupted transmission chains. Samples taken from the highland cities of Ambositra (1,280 m), Tsiroanomandidy (860 m), and Moramanga (920 m) indicate that the highland population of Madagascar remained unaffected by the

Table 3. Protective or risk factors for CHIKV infection in pregnant women from 2 coastal locations Mananjary (N = 195) and Manakara (N = 251), Madagascar, May–July 2010*

| Factor | No. women | Bivariable analysis, n = 446 OR (95% CI)† | Bivariable analysis, n = 446 p value | Multivariable model 1, n = 433 OR (95% CI) | Multivariable model 1, n = 433 p value | Multivariable model 2, n = 376 OR (95% CI) | Multivariable model 2, n = 376 p value |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Bednet use | | | | | | | |
| No | 40 | Reference | 0.70 | Reference | 0.98 | Reference | 0.95 |
| Yes | 400 | 0.87 (0.44–1.73) | | 0.99 (0.47–2.06) | | 1.02 (0.47–2.22) | |
| Parity | | | | | | | |
| Multipara | 324 | Reference | 0.93 | Reference | 0.44 | Reference | 0.65 |
| Primipara | 122 | 0.98 (0.63–1.53) | | 0.79 (0.43–1.44) | | 0.86 (0.44–1.67) | |
| Age, y | | | | | | | |
| <20 | 94 | Reference | 0.67† | Reference | 0.17 | Reference | 0.37 |
| 20–30 | 225 | 0.82 (0.49–1.36) | | 0.70 (0.36–1.34) | | 0.81 (0.39–1.69) | |
| >30 | 125 | 0.87 (0.49–1.53) | | 0.57 (0.26–1.23) | | 0.68 (0.29–1.60) | |
| Weight, kg | | | | | | | |
| <40 | 17 | Reference | 0.001† | Reference | 0.0006 | Reference | 0.001 |
| 40–49 | 242 | 1.22 (0.38–3.87) | | 1.22 (0.38–3.92) | | 1.45 (0.39–5.45) | |
| 50–59 | 142 | 1.82 (0.56–5.88) | | 1.86 (0.57–6.08) | | 2.36 (0.61–9.09) | |
| 60–70 | 32 | 2.53 (0.67–9.47) | | 2.84 0.74–10.8 | | 3.82 (0.85–17.2) | |
| >70 | 8 | 9.75 (1.38–68.8) | | 10.8 (1.52–77.2) | | 11.4 (1.39–93.0) | |
| Trimester | | | | | | | |
| 1st | 9 | Reference | 0.45 | | | Reference | 0.39‡ |
| 2nd | 142 | 0.37 (0.10–1.45) | | | | 0.44 (0.10–1.90) | |
| 3rd | 236 | 0.36 (0.10–1.40) | | | | 0.40 (0.10–1.71) | |

*CHIKV, chikungunya virus; OR, odds ratio.
†Nonparametric test of trend.
‡Mantel-Haenszel test for trend, adjusted for the other variables.

recent chikungunya outbreak.

According to our data, 21% of the women from the coastal cities who were positive for IgG against CHIKV did not report symptoms corresponding to those of chikungunya during the outbreak. Similarly, the proportion of asymptomatic infections during a CHIKV outbreak in a naïve population from northeastern Italy in 2007 was 18% (*21*). In contrast, during the 2005–2006 chikungunya outbreak on La Réunion, only 5% of infections remained asymptomatic (*22*,*23*).

Entomologic data were not collected during the chikungunya outbreak on Madagascar. The main vectors for CHIKV are *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* mosquitoes. In a study from Gabon, *Ae. albopictus* mosquitoes outnumbered *Ae. aegypti* mosquitoes in most suburban areas, and in urban areas, where *Ae. aegypti* mosquitoes were more commonly found, CHIKV and DENV were only found in *Ae. albopictus* (*19*) mosquitoes. *Ae. albopictus* mosquitoes were the main vectors on La Réunion during the 2005–2006 epidemic.

Recent entomologic data for Madagascar were scarce in 2010, when the chikungunya outbreak took place. In a report from 1989, *Ae. albopictus* was identified as the predominant *Aedes* species on the eastern coast and on the central highland plateau, where all our study sites were located (*24*). A recent study provides evidence for an expansion of an invasive lineage of *Ae. albopictus* that has spread throughout the island and possibly caused a decline of *Ae. aegypti* at least in urban areas (*25*). More research on the vector dynamics of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* mosquitoes in Madagascar is needed.

The analysis of risk and protective factors for infection was confined to the epidemic coastal cities. The finding that bednet use had no influence on the risk of CHIKV infection is in accordance with the fact that the chikungunya vectors *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* mosquitoes bite during the daytime. The results indicate a positive association between body weight and the risk for CHIKV infection but the causality could not be assessed in this cross-sectional study. Notably, a study from India found evidence of a higher risk for chronic sequelae among obese persons who acquired chikungunya (*26*). Future studies on risk factors for chikungunya should include body weight as a possible influence.

The 2009–2010 arboviral outbreak in coastal eastern Madagascar was an isolated CHIKV epidemic without relevant DENV co-transmission. With more than one third of all women affected in the epicenter, the infection rate in the population was high. Data from other locations suggest that the epidemic did not spread to higher altitudes and inland.

**Acknowledgments**

We thank the women who participated in the study and the health center staff in Mananjary, Manakara, Ifanadiana, Ambositra, Tsiroanomandidy, and Moramanga for their hospitality and support. We also thank the authorities of the Ministry of Health of Madagascar and the Madagascar office of WHO for supporting the project, the administration of the University of Antananarivo, and the Bernhard Nocht Instititute, whose support facilitated the initiation of this bilateral cooperation. In addition, we are grateful to Klaus Jürries for sketching a map of Madagascar and to Lutz Ehlkes for a final revision of the manuscript with a focus on fluency and language.

We gratefully acknowledge financial support from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, grant SCHW 1549/1-1).

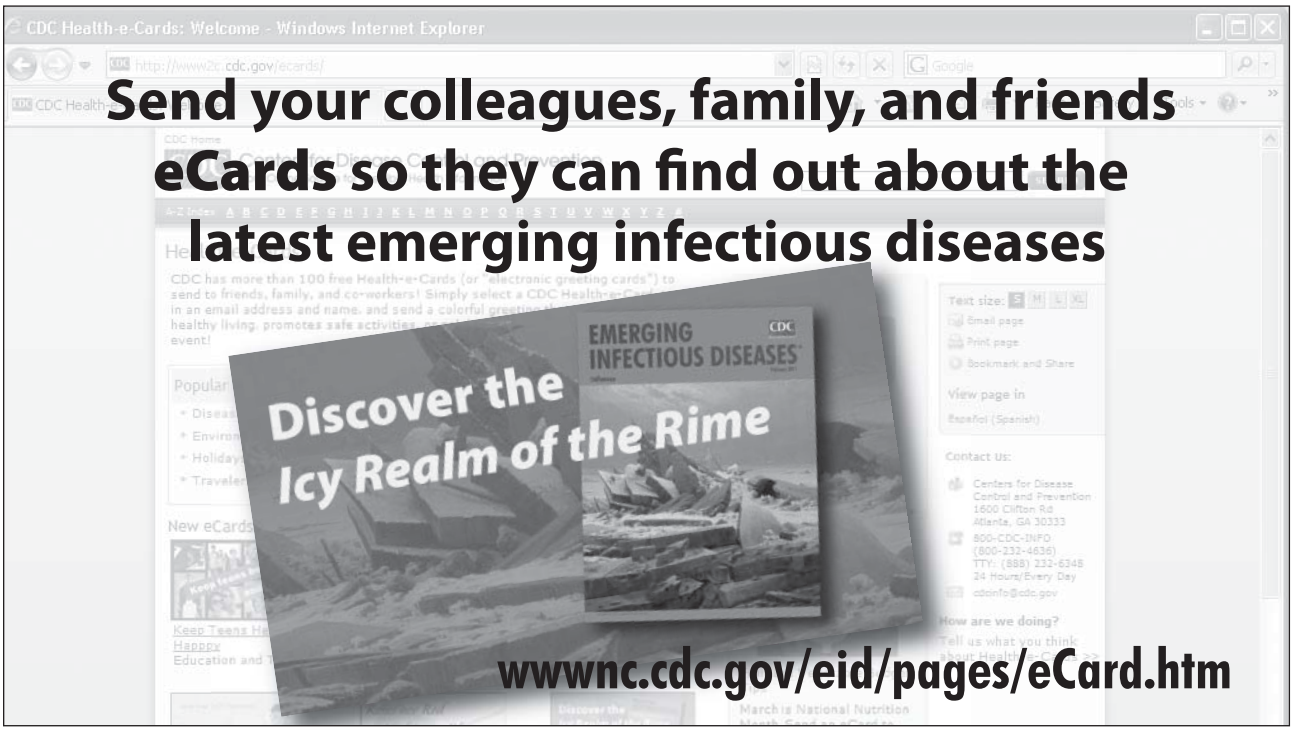
Dr Schwarz is a physician and epidemiologist. He currently works in the Infectious Disease Epidemiology Research Group at the Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine in Hamburg, Germany. His scientific interests are the epidemiology of infectious diseases and the training of public health scientists in epidemiology.

**References**

1. Randrianasolo L, Raoelina Y, Ratsitorahina M, Ravolomanana L, Andriamandimby S, Heraud JM, et al. Sentinel surveillance system for early outbreak detection in Madagascar. BMC Public Health. 2010;10:31. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-10-31
2. International Federation of Red Cross and Red Crescent Societies. DREF [Disaster Relief and Emergency Fund] operation. Madagascar: chikungunya epidemic, February 24, 2010. DREF operation no. MDRMG005 [cited 2010 Oct 7]. http://reliefweb.int/node/346169
3. Powers AM. Chikungunya. Clin Lab Med. 2010;30:209–19. http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2009.10.003
4. Andriamandimby SF, Randrianarivo-Solofoniaina AE, Jeanmaire EM, Ravololomanana L, Razafimanantsoa LT, Rakotojoelinandrasana T, et al. Rift Valley fever during rainy seasons, Madagascar, 2008 and 2009. Emerg Infect Dis. 2010;16:963–70.
5. Morvan J, Rollin PE, Laventure S, Rakotoarivony I, Roux J. Rift Valley fever epizootic in the central highlands of Madagascar. Res Virol. 1992;143:407–15. http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2516(06)80134-2
6. World Health Organization. Outbreak news. Chikungunya and dengue, south-west Indian Ocean. Wkly Epidemiol Rec. 2006;81:106–8.
7. Renault P, Josseran L, Pierre V. Chikungunya-related fatality rates, Mauritius, India, and Réunion Island. Emerg Infect Dis. 2008;14:1327. http://dx.doi.org/10.3201/eid1408.080201
8. Pialoux G, Gauzere BA, Jaureguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. Lancet Infect Dis. 2007;7:319–27. http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70107-X
9. Diallo M, Thonnon J, Traore-Lamizana M, Fontenille D. Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. Am J Trop Med Hyg. 1999;60:281–6.
10. Inoue S, Morita K, Matias RR, Tuplano JV, Resuello RR, Candelario JR, et al. Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys (*Macaca fascicularis*) in the Philippines. J Med Primatol. 2003;32:89–94. http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0684.2003.00015.x

11. Wolfe ND, Kilbourn AM, Karesh WB, Rahman HA, Bosi EJ, Cropp BC, et al. Sylvatic transmission of arboviruses among Bornean orangutans. Am J Trop Med Hyg. 2001;64:310–6.
12. Renault P, Solet JL, Sissoko D, Balleydier E, Larrieu S, Filleul L, et al. A major epidemic of chikungunya virus infection on Réunion Island, France, 2005–2006. Am J Trop Med Hyg. 2007;77:727–31.
13. Kularatne SA, Gihan MC, Weerasinghe SC, Gunasena S. Concurrent outbreaks of chikungunya and dengue fever in Kandy, Sri Lanka, 2006–07: a comparative analysis of clinical and laboratory features. Postgrad Med J. 2009;85:342–6. http://dx.doi.org/10.1136/pgmj.2007.066746
14. Leroy EM, Nkoghe D, Ollomo B, Nze-Nkogue C, Becquart P, Grard G, et al. Concurrent chikungunya and dengue virus infections during simultaneous outbreaks, Gabon, 2007. Emerg Infect Dis. 2009;15:591–3. http://dx.doi.org/10.3201/eid1504.080664
15. Ratsitorahina M, Harisoa J, Ratovonjato J, Biacabe S, Reynes JM, Zeller H, et al. Outbreak of dengue and chikungunya fevers, Toamasina, Madagascar, 2006. Emerg Infect Dis. 2008;14:1135–7. http://dx.doi.org/10.3201/eid1407.071521
16. Tappe D, Schmidt-Chanasit J, Gunther S, Schulze MH, Stich A. Chikungunya and dengue virus antibodies in a traveller with severe arthralgia returning from India. J Clin Virol. 2010;49:148–50. http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2010.05.012
17. Tappe D, Schmidt-Chanasit J, Ries A, Ziegler U, Muller A, Stich A. Ross River virus infection in a traveller returning from northern Australia. Med Microbiol Immunol (Berl). 2009;198:271–3. http://dx.doi.org/10.1007/s00430-009-0122-9
18. Jeanmaire EM, Rabenarivahiny R, Biarmann M, Rabibisoa L, Ravaomanana F, Randriamparany T, et al. Prevalence of Rift Valley fever infection in ruminants in Madagascar after the 2008 outbreak. Vector Borne Zoonotic Dis. 2011;11:395–402. http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2009.0249
19. Paupy C, Ollomo B, Kamgang B, Moutailler S, Rousset D, Demanou M, et al. Comparative role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the emergence of dengue and chikungunya in central Africa. Vector Borne Zoonotic Dis. 2010;10:259–66. http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2009.0005
20. Vazeille M, Mousson L, Martin E, Failloux AB. Orally co-infected *Aedes albopictus* from La Réunion Island, Indian Ocean, can deliver both dengue and chikungunya infectious viral particles in their saliva. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4:e706. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000706
21. Moro ML, Gagliotti C, Silvi G, Angelini R, Sambri V, Rezza G, et al. Chikungunya virus in north-eastern Italy: a seroprevalence survey. Am J Trop Med Hyg. 2010;82:508–11. http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0322
22. Staikowsky F, Le Roux K, Schuffenecker I, Laurent P, Grivard P, Develay A, et al. Retrospective survey of Chikungunya disease in Reunion Island hospital staff. Epidemiol Infect. 2008;136:196–206. http://dx.doi.org/10.1017/S0950268807008424
23. Staikowsky F, Talarmin F, Grivard P, Souab A, Schuffenecker I, Le Roux K, et al. Prospective study of chikungunya virus acute infection in the Island of La Réunion during the 2005–2006 outbreak. PLoS ONE. 2009;4:e7603. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007603
24. Fontenille D, Rodhain F. Biology and distribution of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in Madagascar. J Am Mosq Control Assoc. 1989;5:219–25.
25. Delatte H, Bagny L, Brengue C, Bouetard A, Paupy C, Fontenille D. The invaders: Phylogeography of dengue and chikungunya viruses *Aedes* vectors, on the South West islands of the Indian Ocean. Infect Genet Evol. 2011;11:1769–81. http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.016
26. Padmakumar B, Jayan JB, Menon R, Kottarathara AJ. Clinical profile of chikungunya sequelae, association with obesity and rest during acute phase. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2010;41:85–91.


Address for correspondence: Norbert G. Schwarz, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Infectious Disease Epidemiology, Bernhard-Nocht-Strasse 74, 20359 Hamburg, Germany; email: schwarznorbert@bni-hamburg.de

**Darstellung der Publikation mit Literaturverzeichnis:**

**Darstellung der Publikation im breiteren Kontext und Erläuterung weiterführender Ergebnisse der Dissertation über die Publikation hinaus**

In diesem Kooperationsprojekt zwischen der Universität von Antananarivo in Madagaskar und dem Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg, wurde mittels Nachweis von Anti-Chikungunya-, Anti-Dengue- und Anti-Rifttalfieber-Virus-Antikörpern bei 1244 schwangeren Frauen 3-4 Monate nach dem Ausbruch einer fieberhaften Erkrankung im Februar 2010 an der Ostküste Madagaskars untersucht,

I) ob sich der Ausbruch ins Landesinnere ausgebreitet hat,
II) ob neben einer Chikungunya-Virus-Infektion eine Koninfektion mit dem Dengue- und dem Rifttalfieber-Virus nachweisbar war
III) und welche Prädispositionsfaktoren mit einem erhöhten Infektionsrisiko assoziiert waren.

In zwei Küstenorten lag die IgG Seroprävalenz gegen das Chikungunya-Virus (CHIKV) bei 45% und 23%, die IgM Seroprävalenz betrug 28% und 5%. Die IgG Seroprävalenz gegen das Dengue-Virus (DENV) betrug 17% und 11%, Anti-DENV IgM wurde nicht gefunden. In höher gelegenen Ortschaften (450m-1300m) betrug die IgG Seroprävalenz gegen CHIKV 0%-3%, was die Vermutung erlaubt, dass sich das CHIKV nicht in diese Ortschaften und damit auch nicht ins Landesinnere ausbreitete. Bei vier Frauen konnten IgG-Antikörper gegen das Rifttalfieber-Virus (engl. Rift Valley Fever Virus, RVFV) nachgewiesen werden. Bei dem Ausbruch handelte es sich um eine reine CHIKV-Epidemie, eine Co-Infektion mit DENV oder RVFV konnte nicht nachgewiesen werden. Die CHIKV-Infektion war signifikant häufig mit hohem Körpergewicht assoziiert.

**1) Hintergrundinformationen zur eingereichten Publikationspromotion**

Für die Nomenklatur der Vektoren wurde in der Veröffentlichung der bislang geläufige Name *Aedes* verwendet. In diesen Hintergrundinformationen soll die Änderung der Nomenklatur Anwendung finden, in welcher die Diversifizierung der *Aedes*-Familie und die Erhebung der bisherigen Subspezies *Stegomyia* zur eigenen Spezies innerhalb der *Aedes*-Familie 2003 gemäß der veröffentlichten Liste der *Aedes*-Genera von Reinert et al. beschrieben wurde (1). In den vorgelegten Hintergrundinformationen zur Studie soll Chikungunya im Fokus der Erläuterungen stehen, da es sich nach den Ergebnissen der Studie um einen reinen CHIKV-Ausbruch ohne Dengue- oder Rifttalfieber-Koinfektion handelte.

**Chikungunya**

„Chikungunya“ bedeutet „der gekrümmt Gehende“ in der Sprache der Makonde, einem Bantu-Volk im Südwesten Tansanias und ist eine arbovirale Infektion, die hauptsächlich von den Mücken der *Stegomyia*-Spezies übertragen wird. Im südwestlichen Indischen Ozean wird sie fast ausschließlich von *St. albopicta* und *St. aegypti* übertragen. Auf dem afrikanischen Festland findet eine Übertragung des CHIKV auch durch Mitglieder des *Aedes*-Genus (u.a. *Ae. fulgens* oder *Ae. vigilax)* oder durch *Fredwardsius vittatus* statt (1,2). Erstmalig beschrieben und isoliert wurde das CHIKV im Rahmen einer epidemisch aufgetretenen fieberhaften Erkrankung 1952/53 in Tansania und Uganda (3).

Die Vektoren

*St. albopicta* kommt sowohl in ländlichen Gebieten als auch in vorstädtischen Gegenden vor (4). Sie wird als besonders widerstandsfähig und mit 4-8 Wochen Lebensdauer als relativ langlebig beschrieben. *St. albopicta* macht nur leise Fluggeräusche und ist tagaktiv, was die Schutzwirkung von Moskitonetzen erschwert.

*St. aegypti* ist ebenfalls tagaktiv, brütet in Frischwassertanks und kommt eher in urbanen Gegenden vor. Dort ist sie besonders oft innerhalb von Gebäuden anzutreffen (2). Ein häufiges Vorkommen von *St. aegypti* wurde beispielsweise bei dem CHIKV-Ausbruch 2005/06 in Indien beschrieben (5).

Das Chikungunya-Virus

Das CHIKV gehört innerhalb der Familie der Togaviridae zur Gattung der Alphaviridae, die aus 28 Viren mit teilweise ähnlichen Antigen-Determinanten besteht. Das CHIKV hat ein Einzelstrang-RNA-Genom, ein Kapsid von 60-70 nm Durchmesser und eine Phospholipidhülle und ist sensitiv gegenüber Trockenheit und Temperaturen über 58°C. Bisher konnten zehn CHIKV-Stämme vollständig sequenziert werden, sechs davon wurden während des Ausbruchs 2006 auf La Réunion isoliert (2).

Epidemiologie des CHIKV

Chikungunya kann endemisch (dauerhaftes Auftreten in einer begrenzten Region) oder epidemisch (Inzidenzzunahme innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums) auftreten. Das endemische Auftreten ist gekennzeichnet durch eine große Bandbreite an Vektoren und Reservoirtieren, sowie durch eine kontinuierliche Übertragungsrate bei einer größtenteils immunen Population. Meist werden kleine Ausbrüche in umgrenzten Gegenden oder sporadisch auftretende Krankheitsfälle beschrieben. Diese epidemiologische Situation wird häufig im ländlichen Afrika beobachtet (6).

Das epidemische Vorkommen von CHIKV wird meist bei urbanen Ausbrüchen in Asien beschrieben. Typisch ist ein plötzliches Vorkommen in einer Population mit schwacher Herdenimmunität mit hohen Inzidenzraten, die mit zunehmender Immunität der betroffenen Population wieder rückläufig sind. Ein solches Ereignis wurde bei früheren Ausbrüchen in Asien - aber auch bei dem oben erwähnten Ausbruch in La Réunion - gesehen. CHIKV-Epidemien beginnen wegen der dann hohen Vektordichte (*St. albopicta*, *St. aegypti*) typischerweise in der Regenzeit (2).

Bei der Modellierung eines CHIKV-Ausbruchs ist die Kenntnis der Basisreproduktionszahl $R_0$ von CHIKV notwendig. Sie gibt an, wie viele nichtimmune Personen eine mit CHIKV infizierte Person innerhalb einer Population durchschnittlich ansteckt. Mit ihrer Hilfe kann errechnet werden, in welchem Ausmaß die Bevölkerung zum Zeitpunkt der Berechnung bereits infiziert ist oder wie viele Personen immunisiert werden müssen, um einen Ausbruch zu verhindern. Für die Berechnung von $R_0$ für CHIKV existieren verschiedene mathematische Modelle, die meisten kamen zu einem Wert von $R_0$ zwischen 3 und 4. In der Verhinderung oder Bekämpfung eines möglichen Ausbruchs sollte der Anteil der immunisierten Bevölkerung so weit erhöht werden, dass das Produkt aus $R_0$ und dem nichtimmunisiertem Anteil der Bevölkerung (Nettoreproduktionszahl R) < 1 wird.

Eine Steigerung des Entwicklungsstands der Bevölkerung scheint wenig Einfluss auf die Ausbruchswahrscheinlichkeit zu haben. In Malaysia beispielsweise, ein im Vergleich zu anderen CHIKV-betroffenen Ländern eher wohlhabendes Land, brach 2008/2009 eine CHIKV-Epidemie mit *St. aegypti* als Vektor mit mehr als 5430 Fällen allein im Jahr 2009 aus

(7). In der Emilia-Romagna in Italien wurde 2007 ein CHIKV-Ausbruch mit mehr als 200 Fällen beschrieben. Hier wurde als Vektor *St. albopicta* genannt (8, 9).
Das weltweite Neuauftreten des aus Asien stammenden Vektors *St. albopicta* lässt sich auch durch die verstärkten wirtschaftlichen Verknüpfungen Asiens erklären, bei denen der Vektor als Ei beispielsweise durch aus Asien exportierte Gebrauchtreifen nach Afrika, Europa und in die USA gelangen kann (4). Zudem bringen auch Reiserückkehrer aus Gegenden mit hohen Inzidenzen die Infektion mit. In einigen Publikationen wird diskutiert, dass bei Anwesenheit eines Vektors virämische Rückkehrer nach Südeuropa auch in Europa weitere Ausbrüche auslösen könnten (10, 11).

Die klinischen Symptome der CHIKV-Erkrankung

Die klinischen Symptome einer CHIKV-Erkrankung beginnen nach einer Inkubationszeit von 2-4 (bis zu 12) Tagen abrupt mit hohem Fieber, Kopf-, Rücken-, Muskel- und starken Gelenkschmerzen, die vor allem die großen Gelenke und Endgelenke (ab Handgelenk/Sprunggelenk) betreffen. Häufig kommt es thorakal zu makulopapulomatösem Ausschlag, Gesichtsödemen oder bei Kindern auch zu vesikulösen bis bullösen Ausschlägen, Petechien und Zahnfleischbluten. Auch hämorrhagisches Fieber im Verlauf wurde beschrieben. Die meisten Symptome bilden sich innerhalb von 7-10 Tagen wieder zurück, mit Ausnahme von Gelenksteifheit und -schmerz, die für mehrere Monate bestehen bleiben können. Die Gelenkschmerzen sind es auch, die typisch für Chikungunya und damit für die Abgrenzung von anderen Arbovirus-Infektionen wie das DENV hinweisend sind.
Eine einzelne Überträgermücke kann auch mehrere Arboviren gleichzeitig übertragen. Koinfektionen wurden gelegentlich beschrieben, z.B. Gelbfieber mit CHIKV oder DENV mit CHIKV, z.B. 2005/06 in Toamasina an der Ostküste Madagaskars (12). Durch die Ähnlichkeiten im klinischen Auftreten (Fieber mit Gelenkschmerzen), die gemeinsamen Vektoren und mögliche Koinfektionen ist die Abgrenzung verschiedener Arbovirus-Infektionen (z.B. durch DENV, O'nyong-nyong- oder Sindbis-Viren) erschwert.
Im Unterschied zum DENV wird bei der Infektion mit dem CHIKV ein plötzlicherer Beginn, kürzer andauerndes Fieber und häufigeres Auftreten von Ausschlag, konjunktivaler Injektion und Gelenkschmerzen beschrieben (3).
Auch asymptomatische Verläufe kommen vor, wie im Disskussionsteil der vorgelegten Studie erläutert. So berichteten bei dem beschriebenen Ausbruch in den Küstenstädten der Ostküste Madagaskars 30 der 144 dort IgG-positiv auf das CHIKV getesteten schwangeren Frauen (20.8%) kein Auftreten der von uns erfragten Chikungunya-typischen Symptome. Im Vergleich dazu hatten bei dem Ausbruch in La Réunion 2005/2006 5% der Patienten (13) und bei dem Ausbruch 2007 im italienischen Ravenna 18% der Patienten (14) einen klinisch asymptomatischen Verlauf.
In der Schwangerschaft ist eine vertikale Weitergabe an das ungeborene Kind möglich und bei Erkrankung der Mutter während der Geburt wahrscheinlich. Während des Ausbruchs in La Réunion kamen von 35 bei Geburt ihres Kindes kranken Schwangeren 30 Kinder mit CHIKV-Infektion auf die Welt (2). Weitere Beispiele für die vertikale Weitergabe des CHIKV oder klinische Symptome von Chikungunya bei Neugeborenen wurden von u.a. von Lenglet et al. beschrieben (15).

Diagnostik

Der klinische Verdacht wird durch den Nachweis viraler RNA oder spezifischer Antikörper aus Patientenserum gesichert. Die Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) ist vor allem bei akuten CHIKV-Infektionen unmittelbar nach Auftreten klinischer Symptome nutzbar, da innerhalb der ersten sieben Tage nach Ausbruch der Erkrankung

eine stark erhöhte Virämie vorliegt. Die Amplifikate können auch zur Genotypisierung des CHIKV-Stammes genutzt werden (16). Bei hoher Viruslast kann auch der Nachweis durch Anzucht in der Zellkultur erfolgen. Auch Hämagglutinationstests stehen zur Verfügung (2). In der hier beschriebenen Studie wurden IgM zum Nachweis einer akuten Infektion und IgG zum Nachweis einer länger zurückliegenden Infektion mittels Immunfluoreszenztests nachgewiesen.

Therapie und Prävention

Eine kausale Therapie von CHIKV-Infektionen und einen wirksamen Impfstoff gibt es nicht. Die symptomatische Behandlung basiert auf nichtsteroidalen Anti-Rheumatika zur Schmerzbekämpfung. In-vitro-Versuche einer Studie zur Untersuchung antiviraler Wirksamkeit von Interferon-α, Ribavirin, Glyzyrrhizin und 6-Azauridin gegen CHIKV und Semliki-Forest-Virus zeigten eine synergistische antivirale Wirksamkeit zwischen Interferon-α und Ribavirin gegen CHIKV (17).
Nach überstandener Krankheit besteht eine langanhaltende Immunität. In Tierversuchen wurde auch eine Kreuzimmunität mit anderen Alphaviren nachgewiesen. Bei der Suche nach einem geeigneten Impfstoff durch das *US Army Medical Research Institute* in den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde die weitere Entwicklung eines vielversprechenden Kandidaten mit hohen Serokonversionsraten und neutralisierenden Antikörper-Titern in den neunziger Jahren aufgrund von Interessenverlagerung zunächst ausgesetzt. Eine randomisierte, Placebo-kontrollierte und doppelt verblindete Phase-II-Studie von Edelman et al. gegen Ende des letzten Jahrhunderts zeigte in der Nutzung eines Lebend-Impfstoffes (TSI-GSD-218) eine Serokonversion von 98.3%, Impfreaktionen wurden in 32% der Fälle beschrieben. Eine Phase-III-Prüfung dieses Lebend-Impfstoffs, basierend auf dem CHIKV-Stamm 15561, befand sich 2006 nach Unterzeichnung eines Transfer Agreements mit dem French National Institute of Health and Medical Research (Inserm) in Vorbereitung (18, 19).

Rifttalfieber (engl. Rift Valley Fever, RVF)

Das RVF ist eine insbesondere durch Culex- und Stegomyia-Mücken übertragene virale Erkrankung. Erreger ist das RVF-Virus (RVFV), das unter den Arboviren zur Familie der Bunyaviren gehört. Das Virus ist für Wiederkäuer und den Menschen pathogen. Infektionen beim Menschen treten meist im Rahmen von Tierepidemien auf. Das Virus kann aber auch durch kontaminierte Aerosole oder direkten Kontakt zu infizierten Tieren übertragen werden. Zumeist verläuft das RVF beim Menschen wie eine unspezifische febrile Erkrankung mit Kopf- und Muskelschmerzen; bei etwa 1% der Patienten kommt es 3 bis 4 Tage später zu einem fulminanten hämorrhagischen Fieber mit Hepatitis und häufig letalem Ausgang. Etwa 1 bis 2 Wochen nach Abklingen der febrilen Phase kann es zu einer Enzephalitis kommen, die meist tödlich verläuft. Als Spätkomplikation kann eine Uveo-Retinopathie mit Erblindungsgefahr auftreten. Die Labordiagnose wird durch Virusnachweis mittels PCR, Virusanzucht oder Nachweis von spezifischen Antikörpern gestellt (20).

Denguefieber

Dengue ist die häufigste humane Arbovirose und wird durch Stegomyia-Mückenarten übertragen. Komplizierte hämorrhagische Verläufe werden als hämorrhagisches Denguefieber oder als Dengue-Schocksyndrom bezeichnet. Die erhebliche globale Ausbreitungstendenz beruht auf der seit Jahrzehnten weltweit rückläufigen Vektorbekämpfung und zunehmender Vektorinvasion, der Zunahme urbaner Brutstätten in Verbindung mit permanenten Wasseransammlungen durch starke „Vermüllung“ in den

Armenvierteln der Tropen sowie durch gesteigerte internationale Migration und Reisetätigkeit mit der Folge weltweiter Durchmischung der verschiedenen Denguevirus-Serotypen (21).

**2) Gegenstand der eingereichten Publikationspromotion**

In dieser der Publikationspromotion zugrunde liegenden Studie wurde ein Chikungunya-Ausbruch an der Ostküste Madagaskars hinsichtlich einer potentiellen Verbreitung ins Landesinnere und möglicher Koinfektionen mit DENV und RVFV untersucht.

**Ausbruchsdetektion**

Seit Oktober 2009 stieg die Anzahl der an Fieber Neuerkrankten im Distrikt von Mananjary an der Ostküste von Madagaskar deutlich. Am 08. Februar 2010 stellte das Institute Pasteur in Madagaskar bei einem Patienten die Diagnose einer Chikungunya-Infektion. In der Folge wurden 702 Fälle (263 Patienten davon waren unter 15 Jahre alt) in der Zeit zwischen 09.02.2010 und 15.02.2010 in der Region um Mananjary durch die Internationale Föderation der Rotkreuz- und Rothalbmond-Gesellschaften bestätigt. Davon lebten 600 Patienten in Mananjary und 96 in Irondro, einem kleinen Dorf an der Kreuzung der landeinwärts führenden Straßen aus den Küstenorten Mananjary und Manakara (22).

**Ausbruchsuntersuchung im Rahmen der vorgelegten Promotion**

Zwischen April 2010 und Juli 2010 wurden Blutproben von 1244 schwangeren Frauen an sechs verschiedenen Orten in unterschiedlichen Höhenlagen entnommen (siehe Abbildung 1 der vorgelegten Publikation). Symptome einer CHIKV-Infektion wurden retrospektiv mit einem standardisierten Fragebogen erhoben. Zur Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen CHIKV, DENV und RVFV und IgM-Antikörpern gegen CHIKV und DENV wurden Immunfluoreszenz-Assays durchgeführt. Immunglobulin-Titer >100 wurden als positiv definiert.

**Ergebnisse und Schlussfolgerungen**

Die in den sechs Studienorten gefundenen Seroprävalenzen sind in Tabelle 1 der angehängten Publikation dargelegt. Anti-CHIKV-IgG-Antikörper wurden bei 154 der 1244 Proben nachgewiesen, die höchsten Anti-CHIKV-IgG-Seroprävalenzen waren in den beiden Küstenorten Mananjary (44,6%) und Manakara (22,7%) zu finden. Die Seroprävalenzen in Proben von höhergelegenen Orten waren niedrig. Anti-CHIKV-IgM-Antikörper wurden nur in Proben aus den Küstenorten (Mananjary 27,5% und Manakara 5,2%) gefunden, entnommen etwa 2-4 Monate nach dem Höhepunkt der Epidemie. Trotz Anti-DENV-IgG-Antikörperprävalenzen von 10,8% und 17,4% in den beiden Küstenorten konnten keine DENV-IgM-Antikörper gefunden werden, woraus geschlossen werden kann, dass die IgG-Antikörper von früheren DENV-Infektionen herrührten. RVFV-IgG-Antikörper wurden bei zwei Frauen aus Mananjary, einer Frau aus Manakara und einer Frau aus Tsiroanomandidy gefunden.

Aus den Daten kann geschlossen werden, dass es sich bei der Epidemie um einen CHIKV-Ausbruch ohne DENV- oder RVFV-Koinfektion handelte, dass die Epidemie auf die Küste beschränkt blieb und dass ein Ende des Ausbruchs vor Beginn der hier beschriebenen Untersuchung stattgefunden hatte, da CHIKV-IgG-Antikörper in allen CHIKV-IgM-postitiven Proben gefunden wurden.

Tabelle 2 der Publikation zeigt die retrospektiv berichteten Symptome der von uns im Rahmen des Ausbruchs als CHIKV-infiziert klassifizierten schwangeren Frauen in den Küstenorten. Bei 114 (79,2%) Frauen mit positiv getesteten Serumproben waren seit der

letzten Regelblutung ein oder mehrere der oben beschriebenen klinischen Symptome aufgetreten, wie z.B. Fieber, Gelenkschmerzen, Hautausschlag oder Hüftgelenksvibration. Bei 20,8% der infizierten schwangeren Frauen hatten sich zuvor keine typischen klinischen Symptome gezeigt oder die Frauen konnten sich an die Symptome nicht erinnern.
Das in Tabelle 3 der Publikation verwendete logistische Regressionsmodell zeigt ein mit zunehmendem Körpergewicht ansteigendes CHIKV-Infektionsrisiko. Erwartungsgemäß zeigten Moskitonetze keinerlei protektive Wirkung gegen die CHIKV-Übertragung durch tagaktive Stegomyiamücken. Zum Zeitpunkt der Befragung befanden sich 2% der schwangeren Frauen im ersten, 32% im zweiten und 57% im dritten Trimenon, von 10% der Frauen gab es hierzu keine Angaben.

## 3) Fachbezogene Hintergrundinformationen für die geographische Region

### Das Ausbruch-Frühwarnsystem in Madagaskar

Bis März 2007 hatte es in Madagaskar keine effiziente Ausbruch-Frühwarnüberwachung gegeben. Bis zu diesem Zeitpunkt waren die Meldungen der primären Gesundheitszentren an das Gesundheitsministerium nur monatlich und auf Papier-Formularen erfolgt. Im Falle eines Ausbruchs musste die Meldung schrittweise an die Stufen des Gesundheitssystems weitergegeben werden. Da zudem in vielen Zentren kein Zugang zu Labordiagnostik bestand, waren die Möglichkeiten gering, Verdachtsdiagnosen labordiagnostisch zu sichern. Ab April 2007 wurden überregionale Gesundheitszentren (13 bis Dezember 2008 und 19 bis Juni 2010) geschaffen, an die mindestens einmal wochentäglich mittels verschlüsselter SMS Fieber-, Grippe-, Arbovirus- und Malaria-Verdachtsfälle, sowie Durchfallerkrankungen und Auffälligkeiten gemeldet wurden. Dadurch sollte die Früherkennung von fieber- und durchfallassoziierten Krankheitsausbrüchen gewährleistet werden (23).

### Besonderheiten bei den Chikungunya-Ausbrüchen in La Réunion und Toamasina 2005/06

Der Ausbruch in La Réunion, 2005-2006

Erstmalig beschrieben wurde ein CHIKV-Ausbruch im südwestlichen Indischen Ozean, der ab Januar 2005 auf den Komoren, La Mayotte und Mauritius stattfand. Ende März 2005 wurde das Virus nach La Réunion eingeschleppt und verursachte bis April 2006 eine Epidemie von bemerkenswertem Ausmaß: 2004 maß die Bevölkerung von La Réunion 766000 Personen, bis April 2006 wurden 244000 Fälle (35%) von CHIKV auf der Insel gemeldet. Der Höhepunkt der ersten Infektionswelle wurde im Mai 2005 mit einer wöchentlichen Inzidenzrate von 450 Neuerkrankungen erreicht, die zweite größere Welle begann Ende Dezember 2005 und gipfelte in einer wöchentlichen Inzidenzrate von 47000 geschätzten Neuerkrankungen in der ersten Februarwoche 2006. Zwischen den beiden Höhepunkten während des Winters auf der Südhalbkugel war die Zahl der Neuerkrankungen deutlich abgesunken.
Zusammen mit einer fehlenden Herdenimmunität der Bevölkerung könnten auch Veränderungen der Antigen-Determinanten des CHIKV zur Eskalation des CHIKV-Ausbruchs 2006 in La Réunion beigetragen haben. Schuffenecker et al. berichteten über eine Mutation in Erregerstämmen in der RNA-Sequenz, die an der Expression eines Fusions-Membranproteins beteiligt ist. Diese Mutation wurde nicht in Stämmen aus den ersten Monaten des Ausbruchs auf La Réunion gefunden. Dies könnte ein Zeichen einer stattgefundenen Selektion der Viren durch Anpassung an den Vektor sein (24).

Von der Epidemie waren beide Geschlechter und alle Altersgruppen betroffen, während der ersten Krankheitswelle wurde jedoch ein erhöhter Anteil unter den Älteren und den Frauen verzeichnet. Kinder unter 9 Jahren gehörten zu den am wenigsten, Frauen zu den häufiger betroffenen Gruppen. Bei 41 Patienten wurde eine neonatale Infektion durch vertikale Übertragung beschrieben.
Die Anzahl an schweren Chikungunya-Verläufen belief sich während des genannten Zeitraums auf 123 Fälle, die in 35% letal endeten. Schwere Verläufe waren definitionsgemäß hospitalisierte Patienten älter als 9 Tage mit mindestens einem traumatischen nicht gelenkbetreffenden Syndrom der CHIKV-Infektion und der benötigten Aufrechterhaltung mindestens einer Vitalfunktion bei gleichzeitig mikrobiologisch nachgewiesener CHIKV-Infektion.
Bei 203 Todesfällen stand die Infektion als Begleiterkrankung auf dem Totenschein, in 60% davon wurde sie als mögliche mitbedingende Todesursache genannt. Jedoch konnte der Nachweis der CHIKV-Infektion als alleinige Todesursache dieser Fälle nicht erbracht werden, da postmortale Autopsien nicht durchgeführt worden waren, die die Verbindung zwischen Infektion und Tod hätten bestätigen können (25).
Vazeille et al. konnten während des Ausbruchs die gleichzeitige Präsenz von CHIKV und DENV-1 im Speichel von *St. albopicta* nachweisen (26).

Der Ausbruch 2006 in Toamasina, Madagaskar

Im Januar 2006 wurde ein kombinierter CHIKV- und DENV-Ausbruch mit dem klinischen Auftreten eines Dengue-ähnlichen Syndroms in der Umgebung von Toamasina, einer Hafenstadt an der Ostküste Madagaskars, festgestellt.
Von dem Ausbruch waren alle Altersklassen betroffen, als einziger CHIKV- und DENV-Vektor wurde *St. albopicta* gefunden. Bei 38 von 55 Patientenproben wurde mittels RT-PCR entweder das DENV-1 (24 Patienten) oder das CHIKV (4 Patienten) bestätigt. Bei 10 Patienten wurde eine Koinfektion durch beide Viren festgestellt. Daraufhin wurden Ende März 2006 retrospektiv 4242 randomisiert ausgewählte Einwohner in 803 Haushalten der 27 Wohnbezirken von Toamasina nach dem Auftreten eines Dengue-ähnlichen Syndroms (DLS) in der Zeit von Januar bis März 2006 befragt. Das DLS wurde definiert als Fieber mit zusätzlich mindestens zwei Dengue-ähnliche klinischen Symptomen wie Kopf-, Gelenk- oder Gliederschmerz, Asthenie oder Ausschlag. Dementsprechend waren 67,5% der befragten Personen im untersuchten Zeitraum von einem DLS betroffen, von denen sich 1,4% deswegen in stationärer Behandlung befunden hatten.
Von den befragten Personen berichteten 110 von erneuten Symptomen des DLS im Durchschnitt vier Wochen nach dem erstmaligen Auftreten, was zu der Annahme führte, dass der Ausbruch einen Verlauf mit mehreren Höhepunkte hatte (12).
Dieses wiederholte Auftreten könnte auch durch eine Koinfektion (wie bei 18% der getesteten Patienten) von Chikungunya und Dengue beeinflusst worden sein.

**Literaturliste**

1. J. F. Reinert & R. E. Harbach (2005). Generic changes affecting European aedine mosquitoes (Diptera: Culicidae: Aedini) with a checklist of species.' In: Journal of the European Mosquito Control Association, European Mosquito Bulletin- 19, 1-4

2. Pialoux G, Gauzere BA, Jaureguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. Lancet Infect Dis. 2007;7:319—27. http:// dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70107-X

3. Robinson MC. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. Trans R Soc Trop Med Hyg 1955; 49: 28-32

4. Knudsen AB. Global distribution and continuing spread of Aedes albopictus. Parassitologia. 1995 Dec;37 (2-3):91-7.

5. World Health Organization. Outbreak news. Chikungunya and dengue, south-west Indian Ocean. Wkly Epidemiol Rec. 2006;81:106—8.

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

7. U. Ali, I. Isahak, M.M. Rahman: Chikungunya Confused With Dengue In Malaysia :Clinical, Serological And Molecular Perspective. The Internet Journal of Microbiology. 2011 Volume 9 Number 2. DOI: 10.5580/647 - See more at: http://archive.ispub.com/journal/the-internet-journal-of-microbiology/volume-9-number-2/chikungunya-confused-with-dengue-in-malaysia-clinical-serological-and-molecular-perspective.html#sthash.QxoJx3uy.dpuf

8. Napoli, C., Salcuni, P., Pompa, M. G., Declich, S. and Rizzo, C. (2012), Estimated Imported Infections of Chikungunya and Dengue in Italy, 2008 to 2011. Journal of Travel Medicine, 19: 294–297. doi: 10.1111/j.1708-8305.2012.00640.x

9. Angelini R, Finarelli AC, Angelini P, Po C, Petropulacos K, Silvi G, Macini P, Fortuna C, Venturi G, Magurano F, Fiorentini C, Marchi A, Benedetti E, Bucci P, Boros S, Romi R, Majori G, Ciufolini MG, Nicoletti L, Rezza G, Cassone A. Chikungunya in north-eastern Italy: a summing up of the outbreak. Euro Surveill. 2007;12(47):pii=3313. Available online: http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3313

10. Parola P, de Lamballerie X, Jourdan J, Rovery C, Vaillant V, Minodier P, et al. Novel chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. Emerg Infect Dis [serial on the Internet]. 2006 Oct [*date cited*]. http://dx.doi.org/10.3201/eid1210.060610

11. Stephen Higgs. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. Summer 2006, 6(2): 115-116. doi:10.1089/vbz.2006.6.115.

12. Ratsitorahina M, Harisoa J, Ratovonjato J, Biacabe S, Reynes J-M, Zeller H, et al. Outbreak of dengue and chikungunya fevers, Toamasina, Madagascar, 2006. Emerg Infect

Dis [serial on the Internet]. 2008 Jul [*date cited*]. Available from http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/7/07-1521.htm

13. Staikowsky F, Talarmin F, Grivard P, Souab A, Schuffenecker I, et al. (2009) Prospective Study of Chikungunya Virus Acute Infection in the Island of La Réunion during the 2005–2006 Outbreak. PLoS ONE 4(10): e7603. doi:10.1371/journal.pone.0007603

14. Lenglet Y, Barau G, Robillard PY, Randrianaivo H, Michault A, Bouveret A, Gérardin P, Boumahni B, Touret Y, Kauffmann E, Schuffenecker I, Gabriele M, Fourmaintraux A. [Chikungunya infection in pregnancy: Evidence for intrauterine infection in pregnant women and vertical transmission in the parturient. Survey of the Reunion Island outbreak]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris). 2006 Oct;35(6):578-83.

15. Moro ML, Gagliotti C, Silvi G, Angelini R, Sambri V, Rezza G, et al. Chikungunya virus in north-eastern Italy: a seroprevalence survey. Am J Trop Med Hyg. 2010;82:508-11. http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0322

16. Pfeffer, M. , Linssen, B. , Parker, M. D. and Kinney, R. M. (2002), Specific Detection of Chikungunya Virus Using a RT-PCR/Nested PCR Combination. Journal of Veterinary Medicine Series B, 49: 49–54. doi: 10.1046/j.1439-0450.2002.00535.x

17. Briolant S, Garin D, Scaramozzino N, Jouan A, Crance JM. In vitro inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: synergistic effect of interferon-alpha and ribavirin combination. Antiviral Res. 2004 Feb;61(2):111-7.

18. US Embassy in France; press release, Sept 14, 2006; http://france.usembassy.gov/root/pdfs/press060914.pdf

19. Edelman R, Tacket CO, Wasserman SS, Bodison SA, Perry JG, Mangiafico JA. Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218. Am J Trop Med Hyg. 2000 Jun;62(6):681-5. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=phase+II+safety+and+immunogenicity+study+of+live+chikungunya+virus+vaccine.

20. Abteilung Infektionsepidemiologie des RKI (Robert-Koch-Institut), Epid Bull 03/07, Ansprechpartnerin: Dr. Katharina Alpers. Rift-Valley-Fieber: Ausbruch in den nordöstlichen und den Küstenprovinzen Kenias. 2007; 3: 19. edoc.rki.de/documents/rki_fv/reMpHiY1jShg/PDF/23Jt4FXr1Tx6Q.pdf

21. Stingl P. Denguefieber – Mehr als 50 Millionen Infizierte: Weltweit häufigste Arbovirose mit kontinuierlicher Ausbreitung. Dtsch Arztebl 2005; 102(22): A-1594 / B- 1339 / C- 1263

22. International Federation of Red Cross and Red Crescent Societies. DREF [Disaster Relief and Emergency Fund] operation. Madagascar: chikungunya epidemic, February 24, 2010. DREF operation no. MDRMG005 [cited 2010 Oct 7]. http://reliefweb.int/node/346169

23. Randrianasolo L, Raoelina Y, Ratsitorahina M, Ravolomanana L, Andriamandimby S, Heraud JM, et al. Sentinel surveillance system for early outbreak detection in Madagascar. BMC Public Health. 2010;10:31. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-10-31

24. Schuffenecker I, Iteman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. PLoS Med. 2006 Jul;3(7):e263. Epub 2006 May 23.

25. Renault P, Solet JL, Sissoko D, Balleydier E, Larrieu S, Filleul L, et al. A major epidemic of chikungunya virus infection on Réunion Island, France, 2005—2006. Am J Trop Med Hyg. 2007;77:727—31.

26. Vazeille M, Mousson L, Martin E, Failloux AB. Orally co-infected Aedes albopictus from La Réunion Island, Indian Ocean, can deliver both dengue and chikungunya infectious viral particles in their saliva. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4:e706. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000706

**Erklärung des Eigenanteils an der Publikation**

Ich erkläre hiermit, dass mein Eigenanteil an der vorliegenden Publikation aus Folgendem bestand:

in Hamburg: Planung der Pilotstudie; Planung des Studienablaufs in Absprache mit den Partnern in Madagaskar (Université d'Antananarivo, Madagascar); Erstellung des Interview-Fragebogens; Erstellung einer Excel-Datenbank; unter Anleitung Erstellung einer Datenbank zur quantitativen Auswertung der in Madagaskar zu erhebenden Daten mit Hilfe des statistischen Programms Stata (STATA/SE Software, Version 10); Zusammenstellung des Laborbedarfs

in Madagaskar: sechsmonatiger Aufenthalt in Madagaskar mit Durchführung der Studie an sechs Standorten mit Interview-Durchführung (die Interviews wurden in madagassischer Landessprache von ärztlichen Kollegen durchgeführt); Entnahme, Aufbereitung und Auswertung der Blutproben; Eingabe der erhobenen Daten in Excel und Stata

in Hamburg: Auswertung der Ergebnisse mit Hilfe von Stata; Schreiben der Publikation gemeinsam mit Norbert Georg Schwarz (geteilte Erstautorenschaft); Verfassen der „Darstellung der Publikation im breiteren Kontext und Erläuterung weiterführender Ergebnisse über die Publikation hinaus".

**Danksagung**

Großen Dank möchte ich zuallererst meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen May aussprechen, der die Idee zu dieser Kooperation mit Madagaskar ins Leben gerufen und damit diese Pilotstudie ermöglicht hat, und durch dessen Ansporn und immerwährendes Interesses die Arbeit sich beständig weiterentwickeln konnte.

Gleicher Dank gilt meinem Betreuer Dr. Norbert Georg Schwarz, der zu jeder Zeit für mich ansprechbar war und der mit Geduld jede meiner Fragen freundschaftlich beantwortet hat. Ohne seine Hilfestellung hätte ich diese Arbeit nicht vollenden können.

Des weiteren danken möchte ich im Bernhard-Nocht-Institut den Mitgliedern der Arbeitsgruppe May (Caroline Krefis, Wibke Loag, Lutz Ehlkes und Ralf Krummkamp), die stets für Rat und Hilfe bereitstanden. Wibke Loag danke ich für die Hilfe bei der Erstellung der 4D-Datenbank, PD Dr. Dr. Jonas Schmidt-Chanasit, Deborah Maus und Alexandra Bialonski für die Immunfluoreszenzen und Klaus Jürries für die Erstellung der Landkarte von Madagaskar.

Mein besonderer Dank geht an die Betreuer und Mitarbeiter in Madagaskar, allen voran Prof. Raphael Rakotozandrindrainy, den Mitinitiator dieses Projektes, Übersetzer, ständigen Begleiter und Ansprechpartner in allen Situationen; Dr. Njary Randriamampionona, Christine Njarasoa, Jeanne Fleury Rajanalison, Herly Daniel Ramandrisoa, Maurice Lucien Randriarison.
Ein Dank geht ebenfalls an alle 1244 Teilnehmerinnen der Studie und den helfenden Ärzten und Hebammen in den sechs Standorten Mananjary, Manakara, Ranomafana/Ifanadiana, Ambositra, Tsiroanomandidy und Moramanga.

Zu guter Letzt geht mein Dank auch an meine Familie: an meine Frau, die während dieser Zeit noch viel mehr Geduld aufgebracht hat; an Eltern und Freunde, die mir ihrerseits stets Verständnis und Bestätigung entgegenbrachten.

**Lebenslauf**

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

**Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.
Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.
Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Mirko Girmann