

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin Abteilung für Immunologie und Virologie

Prof. Dr. med. Bernhard Fleischer

Detection of Usutu virus infection in a healthy blood donor from south-west Germany, 2012.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin an der medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Ludger Allering
aus Lingen (Ems)

Hamburg 2015

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 11.04.2016**

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

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Stephan Günther

Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin: Prof. Dr. Nicole Fischer

Inhaltsverzeichnis

1. Publikationsschrift
2. Zusammenfassung
 - Einleitung:
 - Methoden:
 - Ergebnisse:
 - Diskussion:
3. Erklärung des Eigenanteils
4. Danksagung
5. Curriculum Vitae
6. Eidesstattliche Versicherung

1. Publikationsschrift

Der folgende Artikel wurde am 13. Dezember 2012 mit dem Titel:

Detection of Usutu virus infection in a healthy blood donor from south-west Germany, 2012

in dem Journal "Eurosurveillance" veröffentlicht.

Rapid communications

Detection of Usutu virus infection in a healthy blood donor from south-west Germany, 2012

L Allering¹, H Jöst¹, P Emmerich¹, S Günther¹, E Lattwein², M Schmidt³, E Seifried³, V Sambri⁴, K Hourfar^{3,5},
J Schmidt-Chanasit (jonassi@gmx.de)⁵

1. Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, WHO Collaborating Centre for Arbovirus and Haemorrhagic Fever Reference and Research, Hamburg, Germany
2. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Germany
3. German Red Cross Blood Service Baden-Württemberg-Hesse, Frankfurt, Germany
4. Microbiology Unit, Regional Reference Centre for Microbiological Emergencies, Bologna, Italy
5. The authors contributed equally to this study

Citation style for this article:

Allering L, Jöst H, Emmerich P, Günther S, Lattwein E, Schmidt M, Seifried E, Sambri V, Hourfar K, Schmidt-Chanasit J. Detection of Usutu virus infection in a healthy blood donor from south-west Germany, 2012. *Euro Surveill.* 2012;17(50):pii=20341. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20341>

Article submitted on 3 December 2012 / published on 13 December 2012

From September 2011 until November 2012, 31 serum samples from German patients with clinically suspected acute Usutu virus (USUV) infections were tested for USUV-specific antibodies. All samples tested negative. In addition, 4,200 serum samples from healthy blood donors from south-west Germany were collected in January 2012 and also analysed for the presence of specific antibodies. One sample tested positive for USUV-IgG and -IgM. Thus, the seroprevalence of USUV antibodies in healthy blood donors from south-west Germany was low in January 2012.

Following the first detection of Usutu virus (USUV) in the city of Weinheim, Germany, in 2010 and subsequent spread of USUV in mosquitoes and birds in south-west Germany 2011 [1], a study was initiated in 2011 to investigate potential human infections. From September 2011 to November 2012, 31 serum samples from patients in Germany with clinically suspected acute Usutu virus (USUV) infections were collected and tested for USUV-specific antibodies. In addition, in January 2012, 4,200 serum samples from healthy blood donors from south-west Germany were collected and also analysed for USUV-specific antibodies. Although all serum samples from the patients tested negative, one IgG- and IgM-positive blood donor was confirmed to have been infected by USUV by virus neutralisation tests, after eliminating the possibility of serological cross-reactivity to other flaviviruses.

Background

USUV is a mosquito-borne, single-stranded RNA virus that belongs to the Japanese encephalitis virus group within the family *Flaviviridae*. USUV can cause Usutu fever (USUF) in humans, a mild arboviral disease characterised by fever, rash, jaundice and headache. In contrast, in the immunocompromised patient, USUF can present as acute meningoencephalitis. USUV was originally isolated from *Culex neavei* mosquitoes in

South Africa in 1959 [2]. In 2001, USUV emerged outside of Africa and caused an epizootic among birds in Austria [3]. In the following years, USUV was found to circulate in several other European countries including Hungary, Switzerland, Spain and Italy [4]. Reports on clinically apparent human USUV infections are scarce and only four cases are described so far in the literature. The first case occurred in 1981 in the Central African Republic and was a patient with fever and rash, and the second case was a 10-year-old patient with fever and jaundice identified in Burkina Faso in 2004 [5]. In 2009, two human cases with an USUV-related neuroinvasive illness were reported from Italy [6,7]. Consequently, 359 Italian blood donors were tested for the presence of USUV-specific IgG antibodies [8]. Four healthy blood donors tested positive [8].

In August 2010, USUV strain 1477 was isolated from a pool of *Culex pipiens pipiens* mosquitoes that were trapped in the city of Weinheim, south-west Germany [9]. In contrast, all mosquitoes trapped during 2009 in the city of Weinheim had tested negative for USUV [9]. After the initial detection in 2010, the virus spread in 2011 and caused epizootics among wild and captive birds in south-west Germany [1]. We therefore, initiated this study to investigate potential cases of human USUV infection in Germany.

Testing of blood samples for Usutu virus

From September 2011 until November 2012, 31 blood samples from patients in Germany with clinically suspected acute USUV infections (fever, rash or headache) were sent to the World Health Organization (WHO) Collaborating Centre for Arbovirus and Haemorrhagic Fever Reference and Research at the Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine (BNI) in Hamburg and tested for USUV-specific-IgG and -IgM antibodies with an in-house indirect immunofluorescence assay (IFA).

The IFA was validated with USUV positive and negative samples from Italy [6,8]. All samples tested negative.

In addition 4,200 serum samples from healthy blood donors from south-west Germany were collected in January 2012 and analysed for the presence of USUV-specific-IgG antibodies with the in-house IFA. Serum samples that tested positive were further investigated with a commercial USUV IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (EUROIMMUN, Lübeck, Germany) and for serological IgG-cross-reactivity to other flaviviruses such as West Nile virus (WNV), tick-borne encephalitis virus (TBEV), Japanese encephalitis virus (JEV) and yellow fever virus (YFV) by endpoint titration in IFA as described recently [10-13]. In addition, samples were further investigated with virus neutralisation tests (VNTs) as previously described [10,11].

Seventy-nine serum samples originating from different healthy blood donors tested USUV-IgG positive in IFA and this result was confirmed by the commercial USUV-IgG ELISA. Serological cross-reactivity with TBEV, JEV, WNV and YFV was observed and highest endpoint titres against USUV were only demonstrated for nine samples. For 53 samples, the highest endpoint titres were demonstrated against TBEV, whereas 17 samples showed no titre differences between the analysed flaviviruses. As VNT is considered the gold standard for flavivirus serology, the 79 IFA-reactive samples were tested against USUV, WNV, JEV, TBEV and YFV by VNT. One sample showed neutralising antibodies against WNV and for 77 samples highest neutralising antibody titres were demonstrated against TBEV. Only one sample showed a neutralising antibody titre against USUV.

Further investigation of the positive blood sample

Interestingly, the sample with a neutralising antibody titre against USUV also tested positive for USUV- and WNV-IgM in the in-house IFA (Table), demonstrating recent USUV infection. Consequently, four blood samples of the USUV-IgG and IgM positive tested blood donor, taken in the years 2007, 2008, 2010 and 2011 were provided to the BNI for further analysis. An USUV-IgG- and -IgM seroconversion was demonstrated in the blood sample from the year 2011 when compared to the sample from the year 2010 (Table). Moreover, a low anti-TBEV-IgG titre of 1:80 and 1:160 was detected in samples from the years 2008 and 2010, respectively (Table). This titre is most probably related to a previous TBEV vaccination. In addition, one sample showed the highest neutralising antibody titre against WNV (data not shown) and tested negative for WNV-IgM in the in-house IFA, demonstrating a past WNV infection.

The blood donor testing positive for USUV-IgG and -IgM, who was in his forties, reported no history of vaccination against YFV and JEV, and did not have a fever during a period of three months before the blood donation. In addition, he had not been abroad during this period. The blood donor lives in the city of Gross-Gerau (Figure) and dead black birds testing positive for USUV were reported from the district of Gross-Gerau in 2011 [1]. These findings, taken together with the serological results corroborate the hypothesis of a paucior asymptomatic and autochthonous USUV infection of the blood donor during late summer 2011.

Table

Results of serological analysis of a German blood donor at different time points, Germany, 2007-2012

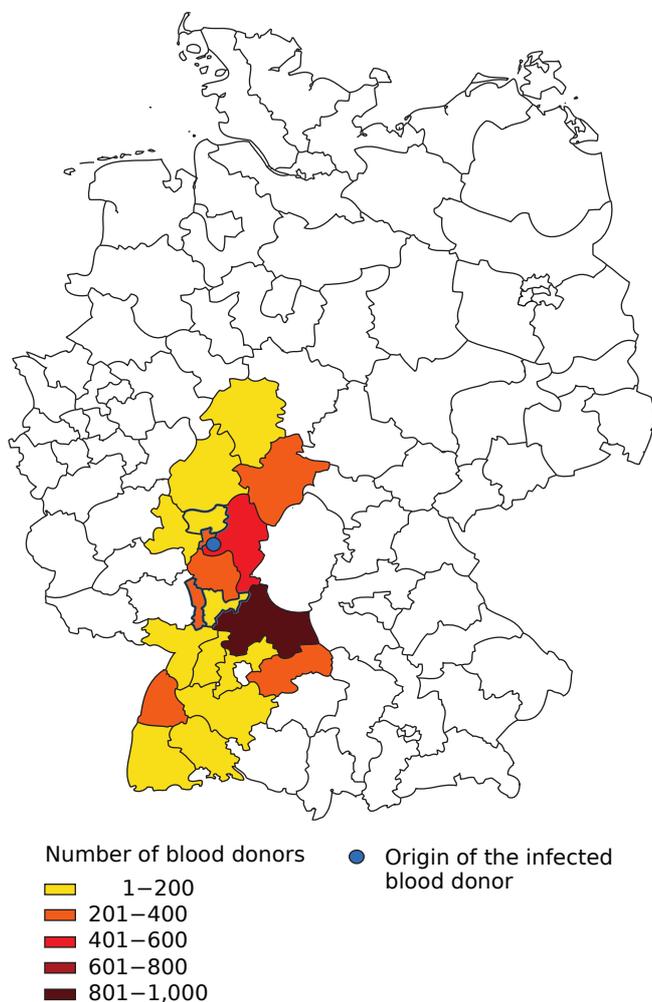
Virus	Immunofluorescence assay (IFA)												Virus neutralisation test (VNT)	
	April 2007		October 2008		October 2010		October 2011		January 2012		April 2012		January 2012	April 2012
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM		
Usutu	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	1:1,280	1:160	1:2,560	1:160	1:2,560	1:40	1:40	1:80
West Nile	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	1:640	1:20	1:640	1:20	1:160	1:20	Neg	Neg
Japanese encephalitis	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	1:2,560	Neg	1:1,280	Neg	1:640	Neg	Neg	Neg
Tick-borne encephalitis	Neg	Neg	1:80	Neg	1:160	Neg	1:1,280	Neg	1:1,280	Neg	1:1,280	Neg	Neg	1:20
Yellow fever	Neg	Neg	Neg	Neg	1:160	Neg	1:1,280	Neg	1:1,280	Neg	1:160	Neg	Neg	Neg

Neg: negative.

Immunofluorescence assay and virus neutralisation test results of < 1:20 were considered negative.

Figure

Origin of samples from healthy blood donors, Germany, January 2012 (n=4,200)



The origin of blood donor serum samples is according to postal code regions. The blue dot represents the city of Groß-Gerau, origin of the blood donor sample testing positive for Usutu virus-IgG and -IgM.

Conclusions

In Italy in 2011, it was shown, that USUV infection can induce clinically asymptomatic viraemic episodes in humans [14]. This, together with the facts that USUV can cause severe disease in immunocompromised patients and could be a potential emerging vector-borne disease in Europe, highlights the need for surveillance to provide information necessary to take adequate prevention measures early. Thus, it was suggested that active human surveillance should be implemented in Europe and performed by detection of USUV RNA in blood donor samples [4]. However, an additional

screening of organ donors for USUV IgG and USUV RNA could become relevant in south-west Germany during late summer. Screening for USUV RNA in cerebrospinal fluid samples from acute meningoencephalitis cases should be performed as well [4]. In conclusion, public health authorities, blood transfusion services and clinicians in Germany should be aware of the risk of USUV infection in humans, especially during late summer.

References

1. Becker N, Jöst H, Ziegler U, Eiden M, Höper D, Emmerich P, et al. Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany. *PLoS One*. 2012;7(2):e32604.
2. Adam F, Digoutte JP. Virus d'Afrique (Base de Données). Centre Collaborateur OMS de Référence et de Recherche pour les Arbovirus et les Virus de Fièvres Hémorragiques (CRORA) [African viruses (database)]. WHO Collaborating Centre for Arbovirus and Haemorrhagic Fever Reference and Research]. Dakar: Institut Pasteur de Dakar. [Accessed 21 Sep 2012]. French. Available from: <http://www.pasteur.fr/recherche/banques/CRORA/>
3. Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A, Lussy H, Rebel-Bauder B, Nowotny N. Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(7):652-6.
4. Vazquez A, Jimenez-Clavero M, Franco L, Donoso-Mantke O, Sambri V, Niedrig M, et al. Usutu virus: potential risk of human disease in Europe. *Euro Surveill*. 2011;16(31): pii=19935. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19935>
5. Nikolay B, Diallo M, Boye CS, Sall AA. Usutu virus in Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011;11(11):1417-23.
6. Cavrini F, Gaibani P, Longo G, Pierro AM, Rossini G, Bonilauri P, et al. Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill*. 2009;14(50):pii=19448. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19448>
7. Pecorari M, Longo G, Gennari W, Grotola A, Sabbatini AM, Tagliacucchi S, et al. First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill*. 2009;14(50):pii=19446. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19446>
8. Gaibani P, Pierro A, Alicino R, Rossini G, Cavrini F, Landini MP, et al. Detection of Usutu-virus-specific IgG in blood donors from northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012;12(5):431-3.
9. Jöst H, Bialonski A, Maus D, Sambri V, Eiden M, Groschup MH, et al. Isolation of Usutu virus in Germany. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85(3):551-3.
10. Schultze-Amberger J, Emmerich P, Günther S, Schmidt-Chanasit J. West Nile virus meningoencephalitis imported into Germany. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(10):1698-700.
11. Tappe D, Schmidt-Chanasit J, Ries A, Ziegler U, Müller A, Stich A. Ross River virus infection in a traveller returning from northern Australia. *Med Microbiol Immunol*. 2009;198(4):271-3.
12. Tappe D, Nemecek A, Zipp F, Emmerich P, Gabriel M, Günther S, et al. Two laboratory-confirmed cases of Japanese encephalitis imported to Germany by travelers returning from Southeast Asia. *J Clin Virol*. 2012;54(3):282-5.
13. Jöst H, Bürck-Kammerer S, Hütter G, Lattwein E, Lederer S, Litzba N, et al. Medical importance of Sindbis virus in south-west Germany. *J Clin Virol*. 2011;52(3):278-9.
14. Gaibani P, Pierro AM, Cavrini F, Rossini G, Landini MP, Sambri V. False positive transcription-mediated amplification assay detection of West Nile virus in blood from a patient with viremia caused by an Usutu virus infection. *J Clin Microbiol*. 2010;48(9):3338-9.

2. Zusammenfassung

2.1 Einleitung:

Das Usutu-Virus (USUV) ist ein von Stechmücken übertragenes Flavivirus. [1]. Das Genom des USUV hat eine Länge von ca. 11,000 Nukleotiden mit einer Typ I Cap-Struktur ohne Poly(A)-Schwanz [3,4,8, 9]. Ein offener Leserahmen kodiert einen aus 3434 Aminosäuren bestehenden Strang, welcher anschließend in Struktur- (Kern, Membran und Hülle) und acht Nichtstrukturproteine (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B und NS5) gespalten wird [8].

Erstmals wurde das USUV im Jahr 1959 in Natal in Süd-Afrika aus einer weiblichen *Culex neavei* Stechmücke isoliert und nach dem Grenzfluss zwischen Südafrika und Mosambik benannt [2]. In Afrika konnte es in Senegal, der Zentralafrikanischen Republik, Nigeria, Uganda, Burkina Faso und der Elfenbeinküste aus Mücken, Nagetieren und Vögeln isoliert werden [11,3].

Die Vektoren des USUV sind *Culex spec.* Stechmücken [12]. Die Eier und Larven der verschiedenen *Culex*-Arten findet man in Pfützen und Astlöchern. Die verschiedenen *Culex*-Arten sind meist ornithophil [13]. Allerdings wurde auch gezeigt, dass einige *Culex*-Arten andere Wirte haben. Sie saugen nicht Blut von Vögeln, sondern von Amphibien, Reptilien und Säugetieren. [14,15,16].

1996 wurde das USUV erstmals außerhalb Afrikas nachgewiesen [36]. In der Toskana verursachte das USUV ein Massensterben von europäischen Amseln (*Turnus merula*). Amseln zeigten aufgrund der USUV-Infektion eine Hepatosplenomegalie, eine neuronale Nekrose mit reaktiver Gliose sowie nekrotische Veränderungen in Leber, Milz und Herz

und starben an einem Multiorganversagen [3, 36]. In den folgenden Jahren verursachte USUV weitere Vogelsterben in Österreich (Sommer 2001), Ungarn (August 2005), Nord-Italien (August 2006), der Schweiz (Spätsommer 2006) und Tschechien (Sommer 2008) [3,4,5,6,7, 23]. Beim Vergleich der Vollgenome der USUV-Stämme aus Süd-Afrika (AY453412), Wien (AY453411) und Budapest (EF206350) wiesen diese eine 97%ige - 99%ige Homologie der Aminosäuren auf [4,8]. Der USUV-Stamm aus der Schweiz wies ebenfalls eine nahe Verwandtschaft zum USUV-Stamm aus Wien auf (> 99% partielle Nukleotidhomologie) [27]. Somit wurden die Epizootien in den verschiedenen Ländern Europas durch USUV-Stämme hervorgerufen, die eng miteinander verwandt sind. Da USUV-RNA unter anderem auch in Rauchschwalben detektiert wurde, vermutet man, dass das USUV durch Zugvögel nach Europa importiert wurde [3]. Dort hat sich das Virus in einheimischen Mückenarten repliziert und wurde dann auf einheimische, ortstreue Standvogelarten wie beispielsweise europäische Amseln oder gekäfigte Vögel, wie Bartkäuze (*Strix nebulosa*) und auch auf den Menschen übertragen [3, 20, 28]. Bei der Untersuchung einer bereits im Jahr 2000 verstorbenen Amsel aus der Region Wien gelang es 2001 ebenfalls USUV RNA nachzuweisen. Der Vergleich einer partiellen Nukleotidsequenz mit den USUV-Sequenzen aus dem im Jahr 2001 verstorbenen Vögeln ergab eine Übereinstimmung von 100%. Auch im Jahr 2002 verursachte derselbe USUV-Stamm noch eine Epizootie in dieser Region. Es wird vermutet, dass das USUV in Österreich endemisch wurde, weil es in der Lage ist, dort in einheimischen Stechmücken zu überwintern [3, 20, 23].

Der italienische USUV-Stamm aus den Jahren 2008/09 wies eine 99,8% - 100% ige Nukleotidsequenz im Vergleich zu den anderen zentraleuropäischen Stämmen aus Österreich und Ungarn auf. Diese enge Verwandtschaft kann wiederum als Hinweis darauf verstanden werden, dass sich ein USUV-Stamm in Europa weiter ausbreitete und keine

neuen USUV-Stämme aus Afrika importiert wurden [19]. Demnach hat das USUV in den einzelnen Ländern Europas einen lokalen Transmissionszyklus mit der Tendenz zur Ausbreitung in Nachbarregionen etabliert [20]. Es wird außerdem vermutet, dass die klimatischen Veränderungen im Rahmen der globalen Erwärmung die Etablierung des USUV in Europa begünstigt haben könnte [24].

Wenige Fälle deuten darauf hin, dass das USUV Krankheiten beim Menschen hervorrufen kann, auch wenn die Pathogenität eher niedrig zu sein scheint [26]. In Afrika gelang es bis jetzt nur in zwei Fällen, das USUV aus menschlichen Proben zu isolieren. Der erste beschriebene Fall ereignete sich 1981 in der Zentralafrikanischen Republik bei einem Patienten, der an Fieber und Hautausschlag litt [17]. Der zweite beschriebene Fall ereignete sich 2004 in Burkina Faso bei einem 10-jährigen Patienten mit Fieber und Ikterus [18]. In Österreich konnte USUV RNA bei einem Patienten mit Exanthem nachgewiesen werden [28].

Im Spätsommer 2009 traten in Nord-Italien, in der Region Emilia-Romagna, zwei Fälle von neuroinvasiven USUV-Infektionen beim Menschen mit tödlichem Verlauf auf. Beide Patienten waren immunkompromittiert aufgrund eines Lymphoms (Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom) bzw. aufgrund medikamentöser Immunsuppression nach Lebertransplantation [21, 22].

Die Anzahl der vermuteten humanen USUV-Infektionen ist niedrig. Dennoch sind weitere Studien notwendig, um die Pathogenität des USUV für Menschen genauer zu erforschen [26].

Im August 2010 wurde der USUV Stamm 1477 aus *Culex pipiens pipiens* Stechmücken isoliert, die in der Stadt Weinheim im Südwesten Deutschlands gefangen wurden. Im Jahr

2009 wurden hingegen alle gefangenen Stechmücken aus dieser Region negativ auf das USUV getestet [32]. Seit Juni 2011 wurden regelmäßig tote Amseln in der Nähe der Städte Mannheim und Heidelberg gefunden. Zudem wurde eine starke Verminderung der Amselpopulation in dieser Region beobachtet [31].

Daraufhin wurden von Juni bis September 2011 insgesamt 223 tote Vögel aus dem oberen Rheintal gesammelt und auf eine USUV-Infektion hin untersucht. USUV-spezifische RNA wurde in den Organen von 86 Vögeln nachgewiesen, die insgesamt sechs unterschiedlichen Arten angehörten. Ein in den toten Vögeln detektierter USUV-Stamm (BH65/11-02-03) war zu 100 % ähnlich (Aminosäureebene) mit dem Stamm 1477 aus dem Vorjahr. Mit dem Nachweis des USUV in antropophilen Stechmücken (*Aedes spec.*) in Deutschland stieg das Risiko einer Infektion von Menschen. Weitere Studien waren notwendig, um die medizinische Relevanz des USUV in Südwest-Deutschland abzuschätzen [29,30].

Aus diesem Grund führten wir im Frühjahr 2012 eine Seroprävalenzstudie mit gesunden Blutspendern in Südwest-Deutschland durch.

2.2. Methoden:

Die Durchführung der Seroprävalenzstudie stützte sich auf eine ähnliche Studie aus Nord-Italien. Dort wurden 359 Serumproben gesunder Blutspender mittels eines ELISAs sowie eines Virus-Neutralisationstests (VNT) auf spezifische Antikörper gegen USUV untersucht. Vier Blutspender wurden positiv getestet [33].

Zur Durchführung der Seroprävalenzstudie in Südwest-Deutschland wurden zunächst 4200 Serumproben von gesunden, freiwilligen Blutspendern aus der Region des oberen Rheintals gesammelt. Die Proben wurden freundlicherweise vom Deutschen-Roten-Kreuz-Blutspendedienst-Baden-Württemberg-Hessen zur Verfügung gestellt. Um Dopplungen der Spender zu vermeiden, wurde vom 02. Januar 2012 bis zum 20. Februar

2012 gesammelt. Spenden sind maximal alle zwei Monate möglich (Frauen alle drei Monate). Die Spender waren zum Zeitpunkt der Spende gesund. Ein Auslandsaufenthalt lag mindestens sechs Monate zurück [35].

Außerdem wurden 31 Serumproben von Patienten mit dem klinischen Verdacht auf eine akute USUV-Infektion (Ausschlag, Fieber, Kopfschmerzen) von September 2011 bis November 2012 gesammelt.

Um die Proben zu lagern, wurde das Serum aus den Entnahmeröhrchen in 2,5 ml Glasfläschchen umgefüllt und bei -20°C eingefroren. Jede Probe wurde mit der Spendernummer, dem Spendedatum und dem Spendeort etikettiert.

In einem ersten Schritt wurden die 4200 Proben mittels Immunfluoreszenz-Assay (IFA) auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen Flaviviren getestet.

Dazu wurden Objektträger mit USUV infizierten Vero-E6-Zellen präpariert: Infizierte Vero-E6-Zellen wurden auf einen Objektträger getropft, über Nacht getrocknet und am nächsten Tag mit Aceton fixiert. Die Objektträger wurden bis zu ihrem Gebrauch bei -20°C gelagert.

Um IgG-Antikörper nachzuweisen, wurde jede Serumprobe jeweils in einer Verdünnung 1:80 und 1:160 auf den präparierten Objektträger aufgetragen und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Nach einem fünfminütigen Waschschrift mit PBS-Puffer, wurde FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-konjugiertes Maus-anti-Mensch-IgG hinzugegeben und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Objektträger wurden wieder für fünf Minuten in PBS-Puffer gewaschen, mit destilliertem Wasser gespült und mit einem Deckglas versehen.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop leuchtete das Zytoplasma der infizierten Vero-E6-Zellen nun bei anti-USUV-IgG-positiven Seren grün auf.

Da eine hohe Kreuzreaktivität der Antikörper gegen Flaviviren besteht, wurden die positiv getesteten Seren in einer Verdünnungsreihe von 1:80 bis 1:20`000 aufsteigend für USUV, West-Nil-Virus (WNV), Japan-Enzephalitis-Virus (JEV), Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (TBEV) und Gelbfieber-Virus (YFV) titriert. Der höchste Antikörpertiter für jedes Virus wurde abgelesen und in eine Excel-Tabelle eingetragen. Die Herstellung der Objektträger für WNV, JEV, TBEV und YFV entsprach der von USUV. Auch die Durchführung des IFA war gleich.

Zur Bestätigung des IFAs wurden alle antikörperpositiven Seren in einem kommerziellen USUV- ELISA der Firma EROIMMUN (Lübeck) nochmals getestet.

In einem zweiten Schritt wurden alle IgG-positiven Seren auf spezifische IgM-Antikörper getestet. Dazu wurden die Seren zunächst mit anti-Human-IgG-Antikörpern vorbehandelt. Die nun vom IgG gereinigten Seren wurden in einer Verdünnungsreihe von 1:20 bis 1:320 aufsteigend auf mit USUV infizierten Vero-E6-Zellen präparierten Objektträger aufgetragen. Die Objektträger wurden für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem fünfminütigen Waschschrift mit PBS-Puffer wurde FITC-konjugiertes-Maus-IgG-anti-Human-IgM hinzugegeben und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte ein weiterer fünfminütiger Waschschrift. Nach kurzer Spülung mit destilliertem Wasser wurde ein Deckglas aufgelegt. Jedes Serum wurde wieder für USUV, WNV, JEV, TBEV und YFV getestet. Der höchste Titer für jedes Virus wurde abgelesen und in eine Excel-Tabelle eingetragen.

In einem letzten Schritt wurden alle im IFA positiv getesteten Seren in einem VNT untersucht. Zur Durchführung wurden 96 – Well – Platten mit je $4 \cdot 10^3$ Vero-E6-Zellen pro

Well präpariert. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden bei 5 % CO₂ und 37°C wuchsen die Vero-E6-Zellen am Boden der Vertiefungen an und konnten weiterverarbeitet werden.

Die Serumproben wurden in einem 56°C warmen Wasserbad für 30 Minuten inkubiert, um das Komplementsystem zu inaktivieren. Danach wurde das Serum in einer Verdünnungsreihe von 1:20 bis 1:1`000 gelöst. Je 50 µL der Serumverdünnung wurden in die Wells auf die vorbereiteten Vero-E6-Zellen gegeben. Danach wurden 50 µL einer Lösung mit insgesamt 50 Plaque-bildenden Einheiten eines Virusstock zu jedem Well gegeben, so dass am Ende jedes Well eine Flüssigkeitsmenge von je 100 µL enthielt. Auch dieser Test wurde jeweils mit USUV (Strain 1477), WNV, JEV, TBEV und YFV durchgeführt. Alle Arbeiten fanden unter S3-Bedingungen statt. Als Positivkontrolle wurde das Serum eines Blutspenders aus Italien verwendet [33,34]. Wenn ein Serum spezifische Antikörper gegen ein Virus enthielt, so wurde das Virus neutralisiert, noch bevor es den Vero-E6-Zellrasen am Boden der Well-Platten infizieren konnte.

Nach einer Inkubationszeit von vier Tagen bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde der Überstand aus den Well-Platten verworfen. Um die Vero-E6-Zellen am Boden der Well-Platte zu fixieren und um verbliebene Viren abzutöten, wurden die Platten für 20 Minuten in ein 5%iges Formaldehydbad gegeben. Danach wurden sie drei Mal mit deionisiertem Wasser gewaschen und mit 50 µL einer 0,05%igen TritonX-Lösung permeabilisiert. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 50 µL einer 10 %igen FCS (Fetales Kälberserum)-Lösung in PBS gestoppt. Es wurde für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden die Platten drei Mal mit Wasser gewaschen.

Um die infizierten Vero-E6-Zellen nachzuweisen, wurde ein kreuzreaktiver muriner monoklonaler Flavivirus-Antikörper verwendet. Nach einer einstündigen Inkubationszeit

bei 37°C wurden die Platten drei Mal mit PBS-Puffer gewaschen. Dann wurde ein POD (Peroxidase)-konjugierter-Ziegen-Anti-IgG-Maus-IgG-Antikörper hinzugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Platten wurden ein letztes Mal mit PBS-Puffer dreifach gewaschen und 50 µL eines TMB-Substrates wurden hinzugegeben. Wenn das Virus nicht neutralisiert wurde, markierte der kreuzreaktive murine monoklonale Flavivirus-Antikörper die infizierten Vero-E6-Zellen. Nicht gebundene Antikörper wurden durch die Waschschriffe beseitigt. Die gebundenen Antikörper dienten als Ziel für den POD-konjugierten Anti-Maus-IgG-Antikörper. Das TMB Substrat verursachte mit dem Sekundärantikörper einen Farbwechsel von farblos zu blau in den Wells, in denen sich infizierte Zellen befanden.

2.3. Ergebnis:

Die 31 von September 2011 bis November 2012 gesammelten Serumproben von Patienten mit dem klinischen Verdacht auf eine akute USUV-Infektion, wurden im IFA alle negativ auf anti-USUV-IgG und -IgM getestet. Auf die Durchführung eines Neutralisationstestes wurde daher verzichtet. Mittels RT-PCR konnte in den Proben keine USUV-RNA nachgewiesen werden.

Von den 4200 Serumproben der Blutspender aus Baden-Württemberg und Hessen wurden 79 Proben im IFA positiv auf IgG-Antikörper gegen USUV getestet. Dieses Ergebnis wurde durch den kommerziellen USUV-IgG-ELISA (EUROIMMUN, Lübeck, Deutschland) bestätigt. Es folgte die Bestimmung der Titer für die unterschiedlichen Flaviviren USUV, WNV, TBEV, YFV und JEV in der IFA:

53 Serumproben zeigten den höchsten Titer für TBEV. 17 Proben zeigten keinen Unterschied im Titer für die jeweils getesteten Flaviviren. 9 Seren zeigten den höchsten Titer für USUV.

Alle 79 positiv getesteten Seren wurden im VNT untersucht. Eine Probe zeigte den höchsten neutralisierenden Titer für WNV. Im IFA konnte kein Anti-WNV-IgM nachgewiesen werden, sodass es sich hierbei um eine länger zurückliegende WNV-Infektion handeln musste.

77 Serumproben wiesen den höchsten neutralisierenden Titer für TBEV auf.

Nur eine Serumprobe zeigte den höchsten neutralisierenden Titer für USUV. Für diese Probe ließen sich im IFA auch IgM-Antikörper nachweisen.

Anhand der Spendernummer konnte mit Hilfe des Deutschen-Roten-Kreuz-Blutspendedienst-Baden-Württemberg-Hessen der Blutspender befragt werden. Es handelte sich um einen 40jährigen Mann aus der Stadt Groß-Gerau. Er sei nicht gegen JEV oder YFV geimpft und habe sich sechs Monate vor der Spende nicht im Ausland aufgehalten. Fieber habe er in einem Zeitraum von drei Monaten vor der Spende ebenfalls nicht gehabt.

Da der Mann regelmäßiger Blutspender war, konnte der DRK-Blutspendedienst hinterlegte Serumproben aus den Jahren 2007, 2008, 2010, 2011 und 2012 zur Verfügung stellen. Im IFA konnte eine anti-USUV-IgG und -IgM Serokonversion für Oktober 2011 im Vergleich zu der Probe vom Oktober 2010 festgestellt werden. USUV RNA konnte mittels RT-PCR in keiner der Proben nachgewiesen werden.

2.4. Diskussion:

Der VNT gilt als Standardtest zur Untersuchung der Immunantwort gegen unterschiedliche Flaviviren. Ein Nachteil des VNTs ist, dass er durch seinen hohen Aufwand zum Screening vieler Proben ungeeignet ist [38]. In unserer Studie konnten wir eine höhere Spezifität des VNTs gegenüber dem IFA bestätigen. Von den neun Proben, die im IFA den höchsten Titer

für USUV zeigten, wies nur eine Probe den tatsächlich höchsten neutralisierenden Titer für USUV auf.

Von 4200 untersuchten Serumproben gesunder Blutspender aus Südwest-Deutschland zeigte eine Probe den höchsten neutralisierenden Antikörpertiter für USUV. Im IFA konnten anti-USUV-IgG und IgM nachgewiesen werden. USUV RNA konnte in der RT – PCR nicht nachgewiesen werden. Dabei ist zu bedenken, dass die RT-PCR-Methode nur im akuten Infektionsstadium einen positiven Nukleinsäurenachweis erbringen kann [37]. Der Spender aus der Stadt Groß-Gerau konnte sich an keine für eine USUV-Infektion typischen Symptome erinnern. In der Region von Groß-Gerau wurden im Jahr 2011 tote Amseln gefunden, die positiv auf USUV getestet wurden [29]. Eine pauci- oder asymptomatische autochthone USUV-Infektion des Blutspenders im Spätsommer 2011 ist damit wahrscheinlich.

In der in Nord-Italien durchgeführten Seroprävalenzstudie, wurden von Juni bis Oktober 2009 insgesamt 359 Serumproben gesunder Blutspender zur Testung eines neuen, selbst entwickelten USUV – ELISAs untersucht. Als Referenztest wurde auch in dieser Studie der VNT verwendet. Vier Proben zeigten den höchsten neutralisierenden Titer für USUV. Bei zwei Proben war der neutralisierende Titer identisch für USUV und WNV [33]. Im Vergleich zu Südwest-Deutschland ist die Seroprävalenz in Nord-Italien also deutlich höher. Eine mögliche Erklärung könnte eine höhere Durchschnittstemperatur in Nord-Italien sein [50]. Es wird angenommen, dass die Transmissionsrate des Virus durch Stechmücken bei einem Anstieg der Durchschnittstemperatur steigt [25].

Die retrospektive Befragung aller positiv getesteten Blutspender in Italien erbrachte keinen Hinweis auf ein febriles Syndrom in einem Zeitraum von vier Monaten vor der Blutspende

[33]. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Befragung des positiv getesteten Blutspenders aus Südwest-Deutschland.

In Italien wurde 2011 gezeigt, dass USUV eine Virämie in asymptomatischen Blutspendern verursachen kann [36]. Andererseits sind auch schwere neuroinvasive Verläufe bei immunkompromittierten Patienten bekannt [21, 22].

Bis heute wird die Frage diskutiert, wie man mit dem Auftreten neuer Pathogene in der Europäischen Union umgehen soll, die eine Bedrohung für die Sicherheit von Blutspendeempfänger darstellen [39, 40]. Dies ist für virämische Spender relevant, die bis zum Spendezeitpunkt keine Symptome aufweisen und bei denen eine Übertragung des Virus über Bluttransfusionen auf den Spender wahrscheinlich oder erwiesen ist [51]. Beispiele für von Mücken übertragene Flaviviren in Europa, die durch Bluttransfusionen übertragbar sind, sind das Dengue - Virus (DENV) und das WNV.

DENV ist ein von *Aedes* spc. Stechmücken übertragenes Flavivirus [40]. Es verursacht das Denguefieber, eine grippeähnliche Erkrankung mit masernähnlichem Hautausschlag. In wenigen Fällen entwickelt sich ein lebensbedrohliches, hämorrhagisches Fieber [51]. In der Europäischen Union wurden Fälle in Frankreich (n = 2), Kroatien (n = 15) und Madeira (n = 2,164) beschrieben. Die Patienten hatten ihr Heimatland nie verlassen [52, 53]. Zwei kleine Ausbrüche von durch Transfusion übertragenem DENV wurden in Hong Kong und Singapur beschrieben [54, 55].

Das WNV wurde im Jahr 2002 in den USA in 23 Fällen durch Transfusion übertragen. Sechs dieser Fälle nahmen einen fatalen neuroinvasiven Verlauf [56]. In der Europäischen Union und in benachbarten Ländern wurde ein Anstieg an autochthonen WNV-Infektionen

dokumentiert [57]. Im Jahr 2010 wurden in Nord-Italien das dritte Jahr in Folge Fälle von WNV-Infektionen bei Menschen diagnostiziert [58]. Die Ausbreitung des WNV in Europa führte zur Anordnung präventiver Maßnahmen durch das Paul-Ehrlich-Institut in Deutschland. Gemäß eines Bescheids vom 11.04.2014 sind Personen die sich länger als zwei Tage in der Zeit vom 01.06. bis 30.11. in Regionen bzw. Ländern Europas mit fortlaufender Übertragung des WNV auf den Menschen aufhielten, für mindestens 28 Tage nach ihrer Rückkehr von einer Blutspende auszuschließen. Negativ auf WNV-Nukleinsäure getestete Spender sind davon nicht betroffen. Zu den betroffenen Ländern zählen Griechenland, Italien, Kroatien, Bulgarien, Rumänien, Ungarn, Serbien, Bosnien und Herzegowina sowie Mazedonien [59]. Ein ähnliches Vorgehen wäre auch für das USUV vorstellbar.

Die weitere Überwachung der Ausbreitung des USUV als neuer potentieller Krankheitserreger in Zentraleuropa ist notwendig.

In Südwest-Deutschland kann das Screening von Organspendern im Spätsommer auf USUV RNA relevant sein. Außerdem sollten bei Patienten mit akuter Meningoenzephalitis ein Screening auf USUV RNA im Liquor durchgeführt werden. Öffentliche Gesundheitseinrichtungen, Blutspendedienste und klinisch tätige Ärzte in Deutschland müssen sich der Möglichkeit einer USUV-Infektion bei Menschen vor allem im Spätsommer bewusst sein.

Literatur

- 1.) Calisher CH, Gould EA: Taxonomy of the virus family Flaviviridae. *Adv Virus Res* 2003, 59: 1-19.
- 2.) McIntosh, BM. Usutu (SA Ar 1776), nouvel arbovirus du groupe B. *Int Catalogue of Arboviruses* 1985; 3: 1059-1060
- 3.) Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A, Lussy H, Rebel-Bauder B, Nowotny N. Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(7):652-6.
- 4.) Bakonyi T, Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, Csorgo T, Lussy H, Chavala S, Bukovsky C, Meister T, Weissenböck H, Nowotny N, 2007, Emergence of Usutu virus in Hungary. *J Clin Microbiol* 45: 3870-3874
- 5.) Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R, Albieri A, Defilippo F, Maioli G, Galletti G, Gelati A, Barbieri I, Tamba M, Lelli D, Carr E, Cordioli P, Angelini P, Dottori M, 2010. Evidence of simultaneous circulation of West Nile and Usutu viruses in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna region (Italy) in 2009. *PLoS ONE* 5: e14324.
- 6.) Steinmetz, HW, Bakonyi, T, Weissenböck, H, Hatt, JM, et al. Emergence and establishment of Usutu virus in and around Zurich, Switzerland-Genomic and pathologic comparison to other central European outbreaks. *Vet Microbiol* 2011; 148: 207-212
- 7.) Hubalek, Z, Halouzka, J, Juricova, Z, Sikutova, S, et al. Serologic survey of birds for West Nile flavivirus in southern Moravia (Czech Republic). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008a; 8:659-666.
- 8.) Bakonyi, T, Gould, EA, Kolodziejek, J, Weissenböck, H, et al. Complete genome analysis and molecular characterization of Usutu virus that emerged in Austria in 2001: comparison with the South African strain SAAR-1776 and other flaviviruses. *Virology* 2004; 328:301-310
- 9.) Hurrelbrink, RJ, McMinn, PC. Molecular determinants of virulence: the structural and functional basis of for flavivirus attenuation. *Adv Virus Res* 2003; 60:1-42
- 10.) Bakonyi, K, Lussy, H, Weissenböck, H, Horniak, A, et al. In vitro host-cell susceptibility to Usutu virus. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:298-301.
- 11.) CRORA. African arboviruses database. 2005; available at www.pasteur.fr/recherche/banques/CRORA/ Last accessed April 21, 2011.
- 12.) CDC. Arbovirus catalog. 1985; available at www.ncid.cdc.gov/arbocat/ last accessed April 21, 2011.
- 13.) Clements, AN. *The Biology of Mosquitoes: Volume 2: Sensory Reception and Behaviour* Wallingford: CABI Publishing, 1999; p. 491-502.
- 14.) Chantler, JA, Boreham, PE, Hill, MN. A study of the host selection patterns of the mosquitoes of the Kisumu area of Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1975; 69: 415-425.
- 15.) Chandler, JA, Highton, RB, Hill, MN. Mosquitoes of the Kano Plain, Kenya. 2. results of outdoor collections in irrigated and nonirrigated areas using human and animal bait and light traps. *J Med Entomol* 1976; 13:202-207
- 16.) Ba, Y, Diallo, D, Dia, I, Diallo, M. Feeding pattern of Rift Valley Fever virus vectors in Senegal. Implications in the disease epidemiology. *Bull Soc Pathol Exot* 2006; 99:283-289.
- 17.) Institut Pasteur de Dakar 1982-1984
- 18.) CRORA, unpublished data
- 19.) Manarolla, G, Bakonyi, T, Gallazzi, D, Crosta, L, Weissenböck, H, Dorrestein, GM,

- Nowotny, N. Usutu virus in wild birds in northern Italy, *Veterinary Microbiology* 2014, 159-163.
- 20.) Weissenböck, H, Kolodziejek, J, Fragner, K. Usutu virus activity in Austria, 2001-2002. *Microbes Infect*; 2003; 5:1132-1136.
- 21.) Perottola, Longo, G, Gennari, W, Grottola, A, et al. First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill* 2009; 14:pii: 19446.
- 22.) Cavrini, F, Gaibani, P, Longo, G, Pierro, AM, et al. Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August-September 2009, *Euro Surveill* 2009; 14:pii: 19448.
- 23.) Chvala, S, Kolodziejek, N, Nowotny, N, Weissenböck, H, Pathology and Viral Distribution in Fatal Usutu Virus Infections of Birds from the 2001 and 2002 Outbreaks in Austria; *J. Comp. Path.* 2004, Vol. 131:176 – 185.
- 24.) Brugger, K, Rubel, F. *Preventive Veterinary Medicine* 88 (2009), 24-31.
- 25.) Chavala, S, Bakonyi, T, Bukovsky, C, Meister, T, Brugger, K, et al. Monitoring of Usutu virus activity and spread by using dead bird surveillance in Austria, 2003-2005; *Veterinary Microbiology* 122 (2007), 237-245.
- 26.) Nikolay, B, Diallo, M, Bouh Boye, CS, Alpha Sall, A. Usutu Virus in Africa; *Vectore-Borne And Zoonotic Diseases*; Vol. 11, Num. 11, 2011; DOI: 10.1089/vzb. 2011.0631.
- 27.) Steinmetz, HP, Tamás, B, Weissenböck, H, Hatt, JM, et al. Emergence and establishment of Usutu virus infection in wild and captive avian species in and around Zurich, Switzerland – Genomic and pathologic comparison to other central European outbreaks. *Veterinary Microbiology*. 2010, doi:10.1016/j.vetmic.2010.09.018.
- 28.) Weissenböck, H, Chvala, S, Bakonyi, T, Nowotny, N. 2007. Emergence of Usutu virus in central Europe: diagnosis, surveillance and epizootology. In Takken, W, Knols, B. (Eds.), *Emerging Pets and Vector-borne Disease in Europe*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, pp. 153-168.
- 29.) Becker N, Jost H, Ziegler U, Eiden M, Hoper D, Emmerich P, et al. Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany. *PLoS One*. 2012;7(2):e32604.
- 30.) Jost H, Bialonski A, Maus D, Sambri V, Eiden M, Groschup MH, et al. Isolation of Usutu virus in Germany. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85(3):551-3.
- 31.) <http://www.hb-birding.de/ornithologisches-forum>
- 32.) Jost H, Burck-Kammerer S, Hutter G, Lattwein E, Lederer S, Litzba N, et al. Medical importance of Sindbis virus in southwest Germany. *J Clin Virol*. 2011;52(3):278-9.
- 33.) Gaibani P, Pierro A, Alicino R, Rossini G, Cavrini F, Landini MP, et al. Detection of Usutu-virus -specific IgG in blood donors from northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012;12(5):431-3.
- 34.) Gaibani P, Pierro AM, Cavrini F, Rossini G, Landini MP, Sambri V. False positive transcription-mediated amplification assay detection of West Nile virus in blood from a patient with viremia caused by an Usutu virus infection. *J Clin Microbiol*. 2010;48(9):3338-9.
- 35.) <https://www.blutspende.de/infos-zur-blutspende/spendeterminrechner/spendeterminrechner.php/> last accessed 20.07.2015; 15:25 Uhr
- 36) Weissenböck H, Bakonyi T, Rossi G, Mani P, Nowotny N. Usutu Virus, Italy, 1996. *Emerg Infect Dis*. 2013 Feb; 19(2): 274–277. doi:10.3201/eid1902.121191
- 37) Cavrini, F, Della Pepa, ME, Gaibani, P, Pierro, AM, et al. A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. *J Clin Virol* 2011; 50:221–223.

- 38) Pierro, A, Gaibani, P, Manisera, C, Dirani, G, et al. Seroprevalence of West Nile virus specific antibodies in a cohort of blood donors in North-Eastern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; in press.
- 39) Lindholm PF, Annen K, Ramsey G. Approaches to minimize infection risk in blood banking and transfusion practice. *Infect Disord Drug Targets*. 2011;11:45–56
- 40) Dodd RY. Emerging pathogens and their implications for the blood supply and transfusion transmitted infections. *Br J Hematol*. 2012;159:135–142.
- 50) http://wiki.bildungsserver.de/klimawandel/index.php/Klima%C3%A4nderungen_in_Europa, last access 06.08.2015. 12:37.
- 51) Schlenke, P. Pathogen Inactivation Technologies for Cellular Blood Components: an Update. *Transfus Med Hemother*. 2014 Jul; 41(4): 309–325. Published online 2014 Jul 21. doi: 10.1159/000365646
- 52) Paty MC. The expansion of vector-borne diseases and the implications for blood transfusion safety: the case of West Nile Virus, dengue and chikungunya (in French) *Transfus Clin Biol*. 2013;20:165–173.
- 53) Rogers DJ, Suk JE, Semenza JC. Using global maps to predict the risk of dengue in Europe. *Acta Trop*. 2014;129:1–14.
- 54) Chuang V, Wong TY, Leung YH, Ma E, Law YL, Tsang O, Chan KM, Tsang I, Que TL, Yung R, Liu SH. Review of dengue fever cases in Hong Kong during 1998 to 2005. *Hong Kong Med J*. 2008;14:170–177.
- 55) Tambyah PA, Koay ES, Poon ML, Lin RV, Ong BK. Transfusion-Transmitted Dengue Infection Study Group. Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. *N Engl J Med*. 2008;359:1526–1527.
- 56) Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, Lanciotti RS, Page PL, Stramer SL, Stobierski MG, Signs K, Newman B, Kapoor H, Goodman JL, Chamberland ME. West Nile Virus Transmission Investigation Team. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N Engl J Med*. 2003;349:1236–1245.
- 57) http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/West-Nile-fever-maps/pages/index.aspx last access: 07.08.2015, 14:58
- 58) Barzon L, Pacenti M, Cusinato R, Cattai M, Franchin E, Pagni S, Martello T, Bressan S, Squar-zon L, Cattelan A, Pellizzer G, Scotton P, Beltrame A, Gobbi F, Bisoffi Z, Russo F, Palu G. Human cases of West Nile virus infection in north-eastern Italy, 15 June to 15 November 2010. *Euro Surveill*. 2011;16:pil19959.
- 59) <http://www.pei.de/DE/infos/pu/zulassung-humanarzneimittel/verfahren/blut-blutkomponenten/wnv-spenderrueckstellung/wnv-spenderrueckstellung-inhalt.html>, last access 04.08.2015 22:20 Uhr

3. Erklärung des Eigenanteils

Meine Arbeit bestand unter anderem aus der Beschaffung der Serumproben in Zusammenarbeit mit dem Deutschen-Roten-Kreuz-Blutspendedienst-Baden-Württemberg-Hessen, dem Transport ins Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin nach Hamburg und in der regelrechten Beschriftung und Lagerung aller 4200 Proben.

Die Präparation der Objektträger für den IFA, die Züchtung der Vero-E6-Zellen sowie die Infektion der Zellen mit den verschiedenen Flaviviren war ein weiterer Teil meiner Tätigkeit. Die zur Infektion verwendeten Viren wurden von mir selber gezüchtet, die Konzentration der Plaque-bildenden Einheiten in den unterschiedlichen Virusstocks selber bestimmt.

Alle Serumproben wurden von mir im IFA auf das Vorhandensein spezifischer IgG- und IgM- Antikörper getestet.

Kernstück der Doktorarbeit war die Durchführung des VNTs der im IFA und im ELISA positiv getesteten Proben unter S3- Bedingungen mit den von mir angelegten und ausgezählten Virusstocks.

In Zusammenarbeit mit Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. habil. Jonas Schmidt-Chanasit war ich an der Analyse und Auswertung der Daten, dem Verfassen und der Einreichung des Manuskriptes des Artikels beteiligt.

4. Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. S. Günther danken, dass er es mir ermöglicht hat, diese Arbeit in seiner Abteilung zu verfassen.

Ganz besonders Danken möchte ich meinem Betreuer Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. habil. Jonas Schmidt-Chanasit für seine Geduld und seine immer schnellen Antworten auf meine Fragen.

Außerdem Danke ich Alexandra Bialonski, Sabine Köhler und Corinna Thomé für die Einführung in den Laboralltag und die freundliche Stimmung.

Auch Frau Dr. rer. nat. Petra Emmerich und Franziska Mathies möchte ich für ihre freundliche Hilfe und ihre Ratschläge danken.

Dem Deutschen-Roten-Kreuz-Blutspendedienst-Baden-Württemberg-Hessen danke ich für die Bereitstellung der Serumproben.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, möchte ich für die moralische und finanzielle Unterstützung danken.

5. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Ludger Josef Allering
Anschrift: Albers-Schönberg-Stieg 19
22307 Hamburg
Telefon: 0162 3303541
E-Mail: 6074360@stud.uke.uni-hamburg.de

Geburtsdatum und -ort: 13.07.1988 in Lingen (Ems)

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

1995 – 1998 Grundschule Salzbergen
1998-1999 Grundschule Goldbeck
1999-2001 Geschwister Scholl Schule, Sekundarschule Goldbeck
2001-2007 Markgraf-Albrecht-Gymnasium Osterburg, Abschluss: Abitur (1,4)

Zivildienst

Dezember 2007 – August 2008 Zivildienst in der Borghardt Stiftung zu Stendal, Wohnheim für körperlich und geistig behinderter Menschen

Studium

01. Oktober 2008 – 30. Juni 2015 Medizinstudium am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Herbst 2010 1. Ärztliche Prüfung (2,5)
Frühjahr 2014 2. Ärztliche Prüfung (2,0)
Mai 2014 – April 2015 Praktisches Jahr
Frühjahr 2015 3. Ärztliche Prüfung (2,1)

Auslandserfahrungen oder -reisen

2006: Einmonatiger Austausch in eine Gastfamilie nach La Chaize Le Vicomte, Frankreich

August – September 2007: Tätigkeit als Erntehelfer (Vendange) in ST. Etienne La Varenne, Frankreich

August – September 2013: Famulatur im Provincial Hospital of Savannakhét, Laos

Sprachkenntnisse Englisch
 Französisch
 Spanisch (Grundlagenkenntnisse)

Sonstiges

April – September 2009 Wahlfach Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung und Therapie

April – Juni 2012 Literaturseminar: „Kritisches Lesen klinischer Studien“

Januar – September 2012 Publikationspromotion am Bernhard-Nocht-Institut Hamburg:
„Detection of Usutu virus infection in a healthy blood donor from south-west Germany, 2012“ (Verteidigung ausstehend)

Januar – September 2012 Mitautorenschaft: „Prolonged polyarthralgia in a German traveller with Mayaro virus infection without inflammatory correlates“

August – September 2012 Studentische Hilfskraft in der Diagnostik (Direktnachweis) des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin

Hamburg, den 10.08.2015

6. 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.

Unterschrift: