

Pandemische Influenza Labor-Serosurvey in Berlin (PILS-Berlin)

**Informationen über eine Sentineluntersuchung des LAGeSo zum Vorkommen
von spezifischen Antikörpern gegen das Pandemische Influenza A/H1N1 Virus
in Berlin**

**Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin
Fachgruppe Infektionsschutz / Infektionsepidemiologie**

In Zusammenarbeit mit dem

**Nationalen Referenzzentrum für Influenza am
Robert Koch-Institut**

**und der
Senatsverwaltung für Gesundheit, Umwelt und Verbraucherschutz
des Landes Berlin**

**Studienplanung, Koordination und
epidemiologische Leitung der
Studie**

Dr. med. Jörg Bätzing-Feigenbaum MPH DTM&P
Fachgruppe Infektionsschutz / Infektionsepidemiologie
Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin
Turmstr. 21 / Haus A
10559 Berlin
Tel.: +49-(0)30-90229-2434
Fax: +49-(0)30-90229-2096
Email: Joerg.Baetzing-Feigenbaum@lageso.berlin.de

Zusammenfassung

Ziel des *Pandemische Influenza Labor-Serosurvey in Berlin (PILS-Berlin)* ist die Bestimmung des Anteils der Personen mit durchgemachter Infektion mit der Neuen pandemischen Influenza A/H1N1 bei Berliner Jugendlichen. Dieses pandemische Influenzavirus trat Anfang 2009 erstmals in Amerika auf und hat sich seit dem auf der ganzen Welt verbreitet. Im Juni 2009 war von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) die höchste Pandemiestufe 6 weltweit ausgerufen worden, was weitreichende Folgen für das Gesundheitswesen der betroffenen Länder implizierte. Influenzanachweise sind nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) meldepflichtig. Die seit Juni 2009 im Land Berlin erhobenen Meldedaten über Labornachweise der Neuen Influenza A/H1N1 ergaben bei Kindern und Jugendlichen die höchsten Inzidenzen (Fallzahlen pro 100.000 Bevölkerung) und sind teilweise deutlich höher als bei älteren Personengruppen. Darüber hinaus fanden sich in allen Altersklassen teilweise deutliche Unterschiede der Inzidenzen zwischen Berliner Bezirken, die sich nur zu einem kleinen Anteil durch die unterschiedliche Altersstruktur der Bezirke erklären ließ.

Die Aussagekraft der zur Verfügung stehenden Meldedaten ist abhängig von einer Reihe von Einflussvariablen. Ob eine Influenzavirusinfektion tatsächlich über das Meldesystem erfasst wird, kann u.a. abhängen vom Verhalten betroffener Patienten im Falle einer Infektion, der Ausprägung des klinischen Bildes der Infektion und der Zahl der asymptomatischen Fälle, dem diagnostischen Vorgehen der behandelnden Ärzte sowie deren Meldeverhalten, den Vorgaben der gesetzlichen Krankenkassen bezüglich Kostenübernahme diagnostischer Maßnahmen und der Aussagekraft der eingesetzten diagnostischen Verfahren und dem Meldeverhalten der untersuchenden Labore.

Mit der geplanten Studie wird es in Deutschland erstmalig möglich, in der Bevölkerungsgruppe mit der höchsten Inzidenz gemeldeter Erkrankungen den Anteil der tatsächlich durchgemachten Infektionen von Neuer Influenza A/H1N1 mittels des Nachweises spezifischer Antikörper zu bestimmen. Außerdem kann überprüft werden, ob die bezirklichen Inzidenzunterschiede tatsächlich verschiedene epidemiologische Verläufe widerspiegeln oder das Ergebnis des Einflusses anderer Faktoren darstellen. Die Ergebnisse des Surveys sind insbesondere unter zwei Aspekten von großer Bedeutung für den Öffentlichen Gesundheitsdienst in Berlin. Zum einen kann rückwirkend der Umfang der Fallerfassung durch Meldungen nach dem IfSG geprüft werden, was auch prospektiv bezüglich zukünftiger Pandemien von großer Bedeutung ist. Zum anderen muss bei einer Bestätigung der gefundenen bezirklichen Inzidenzen untersucht werden, ob diese mit unterschiedlichen Risikofaktoren bzw. unterschiedlichem Präventionsverhalten zusammenhängen.

Es sollen zwei unabhängige Querschnittsstichproben von ca. 400 Proben von Personen aus den Bezirken Steglitz-Zehlendorf und Lichtenberg vergleichend untersucht werden. Diese beiden Bezirke unterscheiden sich deutlich in der Inzidenz der im Jahr 2009 nach dem IfSG gemeldeten Fälle von Neuer Influenza A/H1N1. In Steglitz-Zehlendorf wurde eine sehr hohe, in Lichtenberg eine niedrige Inzidenz gefunden. Der Unterschied war in der Alterklasse der 10 – 14-Jährigen am Deutlichsten ausgeprägt. Die für den Survey erforderlichen Blutproben sollen aus Restblutbeständen von Berliner Laboren gewonnen werden. Die Untersuchung wird als Sentinel-Erhebung nach §§13 und 14 des IfSG durchgeführt und erfolgt anonym und unverknüpfbar. Damit ist eine Einwilligung der Patienten, deren Blut untersucht wird, nicht erforderlich und ein Ethikvotum muss nicht eingeholt werden. Die Stichprobengröße erlaubt statistisch signifikante Nachweise von Unterschieden von mindestens 10% zwischen beiden Stichproben.

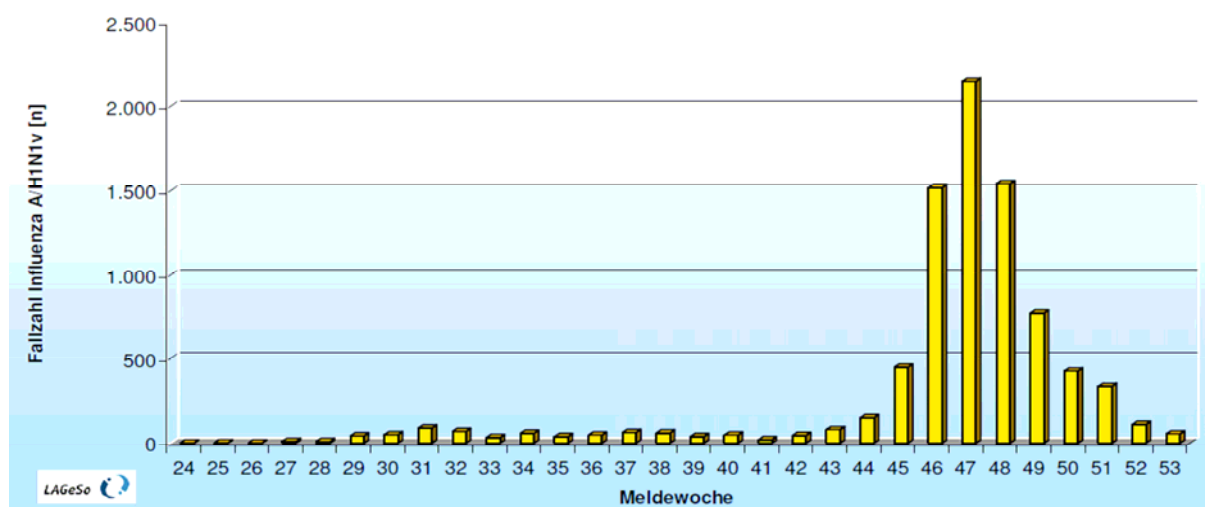
Der Survey soll in der Zeit von Juli bis Oktober 2010 durchgeführt werden. Der aktuelle Wissensstand, Design, Festlegung der Stichprobenumfänge, epidemiologische und Labormethodik, ethische Aspekte und Zeitplan werden im Einzelnen dargestellt. Die bisher verfügbare wissenschaftliche Fachliteratur zu Seroprävalenzstudien der Neuen Influenza A/H1N1 wird im Literaturverzeichnis angeführt (Stand Juli 2010).

1. Einleitung, Stand der Forschung und Studienziele

Im Frühjahr 2009 wurde bei zwei Grippepatienten im Südwesten der USA erstmals ein Influenza A-Virus vom Subtyp H1N1 nachgewiesen, das eine völlig andere Zusammensetzung aufwies als das zirkulierende H1N1 [1]. Das Virus verbreitete sich zunächst in Nordamerika und dann schnell über alle Kontinente. Am 11.6.2009 erklärte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) die höchste Pandemiestufe 6, die in allen Mitgliedsstaaten umfangreiche Maßnahmen des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (ÖGD) und anderer gesellschaftlicher Akteure entsprechend der vorbereiteten Influenza-Pandemiepläne erforderlich machte.

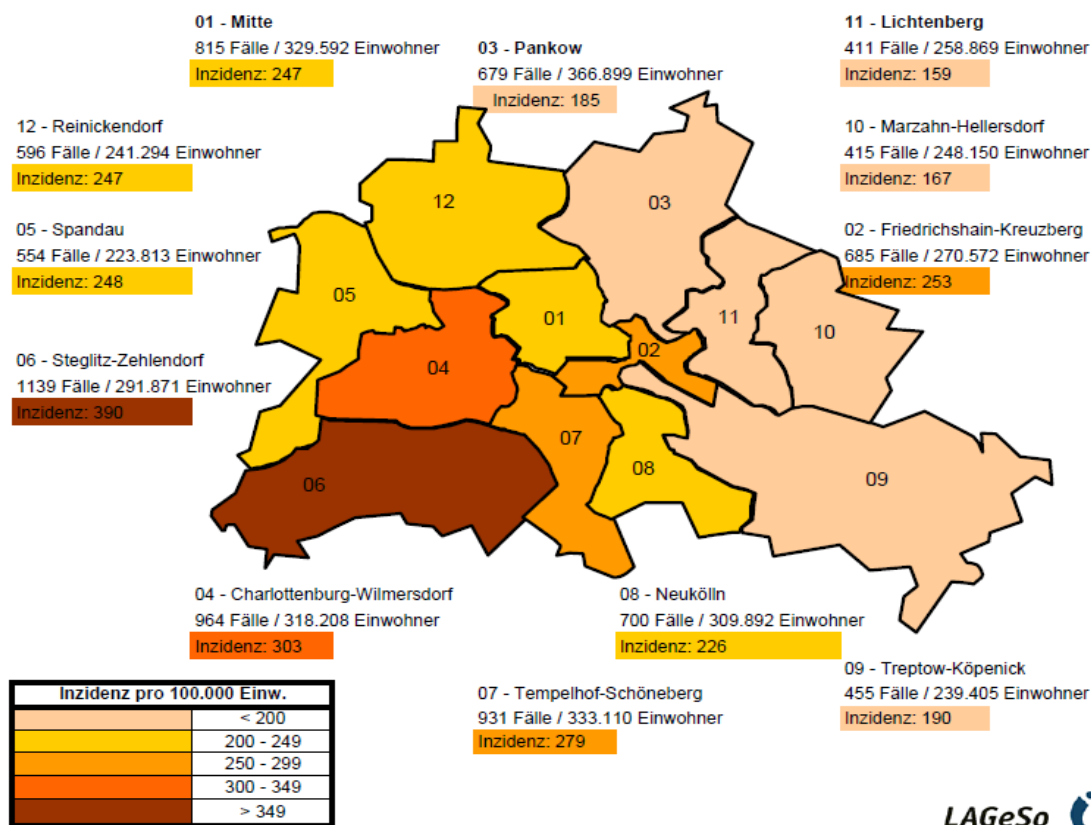
Die Surveillance von Influenza ist in Deutschland allgemein durch die Meldepflicht nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) geregelt ist. Diese umfasst die Meldung klinisch epidemiologischer Erkrankungen, klinisch-labordiagnostisch bestätigter Erkrankungen, labordiagnostisch nachgewiesener Infektionen bei nicht erfülltem klinischen Bild sowie labordiagnostisch nachgewiesener Infektionen bei unbekanntem klinischen Bild [2]. Am 30.4.2009 wurde die Meldepflicht durch eine Verordnung des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) erweitert, um die Surveillance bezüglich der Neuen Influenza A/H1N1 zu intensivieren. Die Ausdehnung der namentlichen Meldepflicht der Ärztinnen und Ärzte nach IfSG auf Fälle von Krankheitsverdacht, Erkrankung oder Tod an Neuer Influenza A/H1N1 verbesserte zunächst die Möglichkeiten, die Weiterverbreitung der Infektion in der Bevölkerung für einen längeren Zeitraum niedrig zu halten. Dieser Zeitraum war insbesondere für die Impfstoffentwicklung notwendig. Am 13.11.2009 wurde durch eine weitere Verordnung des BMG die Meldepflicht durch Ärztinnen und Ärzte zusätzliche zur Regelung im IfSG auf Todesfälle an Neuer Influenza A/H1N1 beschränkt [3, 4].

Abbildung 1: Wöchentliche Fallzahlen der gemeldeten Fälle von Neuer Influenza A/H1N1 in 2009 im Land Berlin (Stand: 10.02.2010; n = 8.344)



In Berlin wurde der erste Fall von Neuer Influenza A/H1N1 mit einer gewissen Verzögerung im Vergleich zum übrigen Deutschland in der 24. Woche 2009 gemeldet. In der 47. Woche wurde mit über 2.000 Fällen die höchste wöchentliche Fallzahl gemeldet; bis zum Ende des Jahres 2009 erreichte die gemeldete Gesamtfallzahl in Berlin 8.344 (Daten des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo); Abbildung 1). Bei der Berechnung der Fallzahlen pro 100.000 Personen Bevölkerung (Inzidenz) und der Analyse dieser Daten fiel die ungleichmäßige geographische Verteilung im Land Berlin auf. Die Spanne der Inzidenzen für das Jahr 2009 lag zwischen 159 / 100.000 Einwohner im Bezirk Lichtenberg und 390 / 100.000 Einwohner im Bezirk Steglitz-Zehlendorf (Daten des LAGeSo; Abbildung 2).

Abbildung 2: Kumulierte Inzidenzen der gemeldeten Fälle von Neuer Influenza A/H1N1 in 2009 im Land Berlin nach Bezirken (Stand: 10.02.2010; n = 8.344; Inzidenzen nicht adjustiert)



LAGeSo 

Insgesamt ergibt sich ein deutliches Gefälle von West nach Ost mit höheren Inzidenzen in den westlichen Bezirken. Auch eine Altersadjustierung konnte diese Unterschiede zwischen den Bezirken nur zu einem sehr geringen Teil erklären. Die Unterschiede zwischen den bereits erwähnten Bezirken Steglitz-Zehlendorf und Lichtenberg verändern sich dadurch mit 385 bzw. 152 pro 100.000 Einwohner in der Relation kaum. Ohne Altersadjustierung ist die Inzidenz in Steglitz-Zehlendorf 2,45-fach, mit Adjustierung 2,53-fach größer als im Bezirk

Lichtenberg. Die Inzidenzen sind am höchsten in den Altersklassen der 4–10-Jährigen und der 11–14-Jährigen. Aber auch innerhalb der Altersklassen sind die Unterschiede zwischen den Bezirken beträchtlich. So findet sich z.B. im Bezirk Charlottenburg-Wilmersdorf eine etwa 3-fach größere Inzidenz bei den 4–10-Jährigen als im Bezirk Marzahn-Hellersdorf (1.903 bzw. 658 pro 100.000 Einwohner) (Daten des LAGeSo; Tabelle 1). Die in Berlin erhöhten Inzidenzen in den jüngeren Altersgruppen entsprechen teilweise auch internationalen Beobachtungen [5].

Tabelle 1: Inzidenzen (Fälle pro 100.000 Einwohner) der gemeldeten Fälle von Neuer Influenza A/H1N1 in 2009 im Land Berlin nach Bezirken und sechs Altersklassen [in Jahren] (Gesamtinzidenzen roh und altersadjustiert)

Bezirk	Inzidenzen (Fallzahlen / 100.000 Einwohner)						gesamt	altersadj.
	<= 3	4 - 10	11 - 14	15 - 30	31 - 59	> 59		
01 - Mitte	465	1.089	1.249	286	130	20	250	267
02 - Friedrichshain-Kreuzberg	345	1.030	1.229	293	145	25	257	282
03 - Pankow	322	847	1.050	233	109	4	187	196
04 - Charlottenburg-Wilmersdorf	935	1.941	1.808	478	133	13	310	282
05 - Spandau	141	893	1.343	437	144	22	251	249
06 - Steglitz-Zehlendorf	1.168	1.903	1.892	634	189	12	396	385
07 - Tempelhof-Schöneberg	714	1.121	1.277	511	141	21	283	279
08 - Neukölln	303	727	1.007	393	109	17	227	238
09 - Treptow-Köpenick	294	794	1.053	329	130	7	194	180
10 - Marzahn-Hellersdorf	409	658	998	257	72	10	168	169
11 - Lichtenberg	282	707	711	275	81	9	159	152
12 - Reinickendorf	515	988	1.386	381	133	14	251	250
Berlin (alle Bezirke)	480	1.068	1.293	361	126	14	246	246

Im Jahr 2010 sind in Berlin im Zeitraum vom 4.1.2010 bis 17.4.2010 nur noch 171 Influenzafälle gemeldet worden. Seit dem 17.4.2010 wurden keine Fälle mehr übermittelt (Daten des LAGeSo).

Nicht bekannt ist, ob die durch Fallmeldung bestimmten Inzidenzen den tatsächlichen Inzidenzen in der jeweiligen Bevölkerung entsprechen. Die tatsächlichen Inzidenzen können u. a. durch Antikörperbestimmungen in Bevölkerungen und Untergruppen der Bevölkerung bestimmt werden. Diese Methode steht für die Neue Influenza A/H1N1 in Deutschland bisher nicht kommerziell zur Verfügung, sondern ausschließlich für epidemiologische Studien am Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Influenza des Robert Koch-Instituts (RKI) in Berlin. Dabei handelt es sich um einen Hämagglutinationshemmtest (HHT), der am NRZ evaluiert wurde [6].

In verschiedenen Ländern wurden inzwischen serologische Methoden eingesetzt, um Antikörperbestimmungen der Neuen Influenza A/H1N1 durchzuführen. So wurden nach einer

US-amerikanischen Studie vor Durchführung von Impfungen gegen H1N1 in Seren von Erwachsenen im Alter von 18–64 Jahren in 6-9%, in über 60-Jährigen in 33% Antikörper gegen die Neue Influenza A/H1N1 gefunden [7]. In einer weiteren Studie in den USA fanden sich entsprechende Antikörper in 4% der vor 1980 und in 34% der vor 1950 geborenen Probanden [8]. Die vermutlich vorbestehende Immunität gegen die neue Variante von Influenza A/H1N1 wurde inzwischen auch mittels anderer immunologischer Methoden bestätigt [9]. Auch Antikörperbestimmungen nach Impfungen gegen H1N1 wurden in den USA durchgeführt [10]. In einer Studie aus Finnland wurden Antikörper gegen H1N1 in Seren, die vor dem Ausbruch der Pandemie gewonnen worden waren, bei 96% der vor 1919 Geborenen gefunden. Bei Personen, die zwischen 1920 und 1944 geboren waren, lag der Anteil mit nachgewiesenen Antikörpern regional unterschiedlich zwischen 14 und 77% [11]. In England wurden Seren aus dem Jahre 2008 und aus dem Jahr 2009 nach der ersten Pandemiewelle, die von den selben Personen gewonnen worden waren, auf Antikörper gegen H1N1 untersucht. Der Anteil der Probanden mit Antikörpern reichte im Jahr 2008 von 1.8% bei Kindern bis zum Alter von 4 Jahren und 31.3% bei Personen, die 80 Jahre oder älter waren [12]. Im Jahr 2009 nach der ersten Pandemiewelle lag der Anteil positiver Proben in London und der Mid Westland Region bei 21.3% für Kinder jünger als 5 Jahre und bei 42% für Kinder im Alter von 5-14 Jahren. In höheren Altersgruppen war der Anteil nahezu unverändert. In anderen Regionen stieg der Anteil lediglich bei den Kindern im Alter bis 14 Jahren auf 6.3% [11]. Eine Studie aus Schottland ergab signifikante Unterschiede der Seroprävalenzen in vier schottischen Städten [13].

Darüber hinaus wurden Antikörperbestimmungen auch bei Serumproben, die von Schweinen gewonnen wurden, eingesetzt, um Kreuzreaktivität zwischen europäischen Schweineinfluenza-Viren und der Neuen Influenza A/H1N1 und amerikanischen Varianten zu untersuchen. Hier fanden sich mehr serologische Kreuzreaktionen als erwartet [14].

Untersuchungen in den USA mit monoklonalen und anderen Antikörpern gegen die Neue Influenza A/H1N1 ergaben eine starke Homologie zum pandemischen Influenzastamm von 1918/19. Dies erklärt die deutlich geringeren Erkrankungsraten an Neuer Influenza A/H1N1 älterer Menschen im bisherigen Pandemieverlauf seit 2009, da in diesen Altersgruppen häufiger kreuzreagierende Antikörper vorhanden sein können [15-17]. Auch aus Italien wird von kreuzreagierenden Antikörpern berichtet [18]. Die WHO hat kürzlich bekannt gegeben, dass bisher weltweit neun Seroprävalenzstudien zur pandemischen Influenza A/H1N1 veröffentlicht wurden und hat diese Studien einem Review unterzogen [19]. Aus Deutschland wurde eine einzige bisher bekannte Studie in diesen Review einbezogen, die am Universitätsklinikum Frankfurt am Main durchgeführt wurde [20]. Hier wurden sowohl präpandemische Seren als auch Seren nach der Pandemiewelle aus dem Klinikum Frankfurt untersucht (unabhängige Stichproben). Anfangs war der Anteil mit Nachweis H1N1-

spezifischer Antikörper in den höheren Altersgruppen höher, nach der Pandemiewelle verlagerte sich die Verteilung in Richtung des Altersmittelwertes [20]. Darüberhinaus wurden weitere Seroprävalenzstudien zur pandemischen Influenza A/H1N1 aus China (Volksrepublik), Taiwan (Republik China) und Singapur publiziert [21-23]. Bei den Untersuchungen in Asien fällt auf, dass die vorbestehenden gegen H1N1 kreuzreagierenden Antikörper bei Älteren nicht so häufig zu sein scheinen wie in Nordamerika und Europa. Allerdings fanden sich bei einer Untersuchung in Japan wiederum Ergebnisse, die nicht in dieses Bild passen [24]. In den USA wurde nachgewiesen, dass im Jahr 1976 gegen „Swine Flue“ geimpfte Personen vermehrt neutralisierende Antikörper gegen die Neue Influenza besitzen [25].

Im Rahmen dieser Studie sollen zwei Fragestellungen untersucht werden:

- Unterscheidet sich die Inzidenz gemeldeter Fälle von Neuer Influenza A/H1N1 in Berlin von der Inzidenz des Nachweises spezifischer Antikörper und damit durchgemachter Infektionen?
- Lassen sich Unterschiede in der Inzidenz der gemeldeten Fälle von Neuer Influenza A/H1N1v in den Berliner Bezirken durch spezifische Antikörperbestimmung bestätigen?

Aus methodischen Gründen kommen für diesen Survey insbesondere die jüngeren Bevölkerungsgruppen in Frage. Wie entsprechende Voruntersuchungen aus anderen Ländern zeigen, ist bei diesen davon auszugehen, dass nur ein extrem geringer Anteil jüngerer Personen bereits vor der Pandemiewelle Antikörper gegen H1N1 aufwies. Über die Ursachen für die zwischen Berliner Bezirken gefundenen Inzidenzunterschiede ist noch nichts bekannt.

Sollten sich die in den Meldedaten gefundenen Unterschiede serologisch bestätigen, müssen folgende Ursachen diskutiert werden: Unterschiedliche Exposition (z.B. auch Reiseverhalten insbesondere in der Frühphase der Pandemie) und unterschiedliches Präventionsverhalten (z.B. individuelle Hygiene oder Hygiene in Gemeinschaftseinrichtungen). Sollten sich die Unterschiede serologisch nicht bestätigen oder eher verringern, müssen z.B. Differenzen im Patientenverhalten und im ärztlichen Verhalten (Anordnung von spezifischer Diagnostik) diskutiert werden. Diese Fragestellungen sollen in einem weiteren Survey untersucht werden (Fragebogenbefragung unter Berliner Schülern zum Gesundheitsverhalten während der initialen und der zweiten Pandemiewellen in 2009).

Die Klärung dieser Fragestellungen im Rahmen dieses Surveys dient vorrangig der Vorbereitung auf kommende Influenza-Epidemien oder auch - Pandemien. Es wird erwartet,

dass aus den Ergebnissen relevante bevölkerungsbezogene Präventionsmaßnahmen für das Land Berlin abgeleitet werden können. Außerdem sollen die Ergebnisse dazu beitragen, die Interpretation der Meldedaten im Rahmen von Influenza-Pandemien auf regionaler Ebene zu verbessern. Gleichzeitig soll die Zuverlässigkeit der Meldedaten und deren Vorhersagewert die zukünftige Pandemiebekämpfung durch den ÖGD unterstützen.

2. Studiendesign sowie Stichprobengröße und -gewinnung

Bei der Studie handelt es sich um eine Querschnittsstudie mit zwei unabhängigen Stichproben von Personen, die in den Bezirken Steglitz-Zehlendorf (Population 1) oder Lichtenberg (Population 2) leben. Die Seroprävalenzraten von Antikörpern gegen die Neue Influenza A/H1N1 zum Untersuchungszeitpunkt sollen verglichen werden. Kriterium für den Einschluss der Blutprobe in die Stichprobe sind:

- (1) Einsendung der Blutprobe durch einen niedergelassenen Arzt aus Berlin an das rekrutierende Labor im Rahmen einer diagnostischen Blutentnahme im ambulanten Segment;
- (2) Alter der Patienten zwischen 10 und 30 Jahren (stratifiziert in vier 5-Jahres-Altersklassen);
- (3) Postleitzahl (PLZ) des Wohnsitzes der Patienten liegt im Bereich der Berliner Bezirke Steglitz-Zehlendorf (PLZ: 12157, 12161, 12163, 12165, 12167, 12169, 12203, 12205, 12207, 12209, 12247, 12249, 12277, 12279, 14109, 14129, 14163, 14165, 14167, 14169, 14193, 14195, 14197 und 14199) oder Lichtenberg (PLZ: 10315, 10317, 10318, 10319, 10365, 10367, 10369, 13051, 13053, 13055, 13057 und 13059).

Der Bevölkerungszahlen der Untersuchungspopulationen werden in Tabelle 2 dargestellt. Die Blutproben werden in der Latenzphase nach der bisherigen Hauptwelle der Pandemie, die in Berlin im letzten Quartal des Jahres 2009 lag, gewonnen. Präpandemische Vergleichsproben können nicht mehr requiriert werden und werden somit nicht untersucht. Die Altersbeschränkung begründet sich dadurch, dass in diesen Altergruppen die geringste Wahrscheinlichkeit besteht, dass präpandemisch Antikörper gegen die Neue Influenza A/H1N1 vorhanden waren. Die Untersuchung schließt ausdrücklich die beiden genannten Bezirke ein, da sich zwischen diesen in der Untersuchungspopulation der 10 – 29-Jährigen die größten Inzidenzunterschiede der in 2009 gemeldeten Fälle von Neuer Influenza A/H1N1 gefunden haben.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Untersuchungspopulationen (Altersspanne 10 – 30 Jahre) in den Bezirken Steglitz-Zehlendorf (Population 1) sowie Lichtenberg (Population 2) nach vier Altersklassen (Stand: 31.12.2008; Amt für Statistik Berlin Brandenburg [26])

Altersklassen	Steglitz-Zehlendorf	Lichtenberg
10 - 14 Jahre	12.765	8.276
15 - 19 Jahre	13.612	13.912
20 - 24 Jahre	15.095	21.501
25 - 30 Jahre	18.054	22.693
10 - 30 Jahre	59.526	66.382

Nachteilig ist, dass durch die gewählte Stichprobenziehung die Repräsentativität derselben nicht gewährleistet ist. Nach Abschluss der Stichprobensammlung steht nur die Alterszusammensetzung für eine partielle Überprüfung zur Verfügung. Eine Reihe anderer Verzerrungen sind ebenfalls zu erwarten (u.a. Selektion „nicht gesunder“ Personen). Durch den Ausschluss stationärer Patienten soll hier zumindest versucht werden, diese mögliche Bias abzuschwächen. Venöse Blutentnahmen zielgerichtet und ausschließlich für diese Studie durchzuführen, erscheint allerdings aus ethischer Sicht bedenklich, insbesondere was die notwendigen Proben aus der Gruppe der 10-18-Jährigen angeht. Der Anteil antikörperpositiver Fälle, die gegen pandemische Influenza geimpft wurden, kann über den altersgruppenspezifischen Impfstoffverbrauch in den beiden Bezirken geschätzt werden, was m. E. eine Korrektur der durch Impfung falsch positiven Ergebnisse möglich machen kann. Die Stichprobengröße soll in beiden Bezirken bei jeweils 350 - 400 Fällen liegen. Mit einer Power von $\alpha=0,8$ und einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ können Unterschiede von Stichprobenanteilen von 10% zwischen zwei Stichproben bei Stichprobengrößen von jeweils etwa $n=200$ bis $n=390$ nachgewiesen werden (Spanne der Anteile in der Stichprobe mit kleinerem Anteil liegt bei dieser Kalkulation zwischen 10 und 40%; EpiCalc 2000, Version 1.02).

In Berlin sind bei der Kassenärztlichen Vereinigung Berlin (KV Berlin) Laborärzte an 21 Laboren registriert, bei denen zumindest ein kassenärztlich zugelassener Laborarzt tätig ist, sowie weitere sechs hausärztliche Laborgemeinschaften niedergelassener, klinisch tätiger Ärzte (Homepage der KV Berlin [27]). Diese Labore sollen angeschrieben, informiert und um Teilnahme bei der Gewinnung der Seren gebeten werden. Es wird damit gerechnet, dass zehn Labore teilnehmen. Der Zeitraum für die Sammlung von etwa zwei mal 400 Seren entsprechend der Einschlusskriterien wird mit drei Monaten veranschlagt. Methodisch ähnelt

das für diesen Survey gewählte Vorgehen dem in der Publikation aus Schottland dargestellten Verfahren [13].

3. Methoden

3.1 Blutprobengewinnung

Die Serumproben werden über Restblutproben aus Blutuntersuchungen von Patienten gewonnen, die in Berlin niedergelassene Ärzte konsultiert haben und bei denen im Rahmen der ärztlich veranlassten Diagnostik Laboruntersuchungen mit venösen Blutentnahmen veranlasst wurden. Benötigt werden ca. 0,5 ml Serum pro Fall. Die Labore werden im Juli 2010 über die Studie informiert und um Teilnahme gebeten.

3.2 Antikörpernachweis

Der Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgt am NRZ für Influenza am RKI oder einem anderen beauftragten Labor mittels Mikroneutralisationstest (MNT) oder Hämagglutinationshemmtest (HHT).

Diese Verfahren wurden bereits für verschiedene saisonale Influenza A-Virentypen eingesetzt. Bei Vogelgrippevirus A/H5N1 gilt der MNT als Goldstandard mit der best möglichen Sensitivität und Spezifität. Für die pandemische Neue Influenza A/H1N1v stehen weltweit bisher nur wenig Daten zur Verfügung. Hier erwies sich aber auch der HHT mit Truthahn- und Meerschweinchenerythrozyten als geeignet, um spezifische Antikörper nachzuweisen. In Deutschland wurde am NRZ für Influenza eine entsprechende Methode entwickelt und evaluiert. Dieser Test ist jedoch nicht kommerziell erhältlich und kann zur Zeit ausschließlich am NRZ oder an beauftragten Laboren durchgeführt werden [6].

3.3 Statistische Analyse

Die Datenanalyse erfolgt mit den üblichen statistischen Verfahren (χ^2 , t-Test, nicht-parametrische Tests) mittels Standardsoftware PASW Version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

4. Aufwandsentschädigung für teilnehmende Labore

Für die teilnehmenden Labore ist eine pauschale Aufwandsentschädigung vorgesehen.

5. Datenpflege und Datenschutz

Die erhobenen demographischen Basisdaten und Ergebnisse der serologischen Untersuchungen werden am Landesamt für Gesundheit und Soziales und am NRZ für Influenzaviren am Robert Koch-Institut in eine Access-Datenbank eingegeben und gehalten. Es gelten die Bestimmungen wie für die Datenhaltung der Meldedaten nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG). Die Daten können in anonymisierter Form und nach gemeinsamer Absprache zwischen LAGeSo, dem NRZ für Influenza und der Senatsverwaltung für Gesundheit, Umwelt und Verbraucherschutz (SenGUV) veröffentlicht werden.

6. Ethische Aspekte

Bei dieser Studie handelt es sich um eine Sentinel-Erhebung nach §§13 und 14 IfSG, wobei die Erhebung hier über anonyme unverknüpfbare Restblutproben aus Laboren erfolgt. Da es sich bei der Studie um ein Surveillance-Instrument nach dem IfSG handelt, ist keine Patienteneinwilligung erforderlich. Ein Ethik-Votum muss nicht eingeholt werden.

Das IfSG nennt zwei Gründe für die Durchführung von zusätzlichen Sentinels im Sinne der „...Erhebung

(1) der Verbreitung übertragbarer Krankheiten, wenn diese Krankheiten von großer gesundheitlicher Bedeutung für das Gemeinwohl sind und die Krankheiten wegen ihrer Häufigkeit oder aus anderen Gründen über Einzelfallmeldungen nicht erfasst werden können;

(2) des Anteils der Personen, der gegen bestimmte Erreger nicht immun ist, sofern dies notwendig ist, um die Gefährdung der Bevölkerung durch diese Krankheitserreger zu bestimmen [28].“

Diese Studie wird unter Berücksichtigung der Vorschriften des Deutschen Arzneimittelgesetzes, der Richtlinien der Deklaration von Helsinki zur biomedizinischen Forschung am Menschen in der revidierten Fassung von Edinburgh, Schottland, Oktober 2000, der Bekanntmachungen von Grundsätzen für die ordnungsgemäße Durchführung der klinischen Prüfung von Arzneimitteln sowie der Richtlinien der Europäischen Gemeinschaft und der *International Conference of Harmonization* durchgeführt.

7. Zeitplan

Folgender Zeitplan ist für die Durchführung der Studie vorgesehen (1.7.2010 - 31.3.2011):

- Anschreiben der Berliner Labore und Kontaktaufnahme für Vorbesprechungen: Juli 2010
- Sammlung von Restproben an Berliner Laboren (beteiligte Labore und LAGeSo): August - Oktober 2010
- Laboruntersuchungen [NRZ Influenza]: September - November 2010
- Epidemiologische Analysen (LAGeSo): November 2010 - Januar 2011
- Auswertung und Veröffentlichung (LAGeSo und NRZ): Januar - März 2011

8. Literaturverzeichnis

[1] Novel Swine-origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team: Emergence of a novel swine-origin influenza A virus in humans. *N Engl J Med* 2009;360:159-63

[2] Robert Koch-Institut: Falldefinitionen des Robert Koch-Instituts zur Übermittlung von Erkrankungs- oder Todesfällen und Nachweisen von Krankheitserregern. Ausgabe 2007. Link: http://www.rki.de/cln_160/nn_200532/DE/Content/Infekt/IfSG/Falldefinition/IfSG/Falldefinition,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Falldefinition.pdf

[3] Robert Koch-Institut: Hinweise für Ärzte zur Meldung des Todes an Neuer Influenza A/H1N1 und zu Maßnahmen bei Fällen mit Neuer Influenza A/H1N1. Berlin 2009. Link: http://www.rki.de/cln_160/nn_200120/DE/Content/InfAZ/I/Influenza/IPV/Schweinegrippe_HinweiseArzt,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Schweinegrippe_HinweiseArzt.pdf

[4] Poggensee G, Gilsdorf A, Buda S, Eckmanns T, Claus H, Altmann D, Krause G, Waas W, and the Working Group Pandemic Influenza A(H1N1): The first wave of pandemic influenza A(H1N1) in Germany: from initiation to acceleration. *BMC Infectious Diseases* 10 (2010), 155 (doi:10.1186/1471-2334-10-155)

[5] Reichert T, Chowell G, Nishiura H, Christensen RA, McCullers JA : Does Glycosylation as a modifier of Original Antigenic Sin explain the case age distribution and unusual toxicity in pandemic novel H1N1 influenza?. *BMC Infectious Diseases* 2010;10:5 [doi:10.1186/1471-2334-10-5]. Link: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/10/5>

[6] Schweiger B: Diagnose. In: Zepp F, Ruf BR (ed.): *Kompodium Influenza 2009 – H1N1 Update*. 2009 [ISBN978-3-642-10312-4]

[7] Centers for Disease Control & Prevention: Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A(H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine. *MMWR* 2009;58(19):521-4

- [8] Hancock K, Veguilla V, Lu X, Zhong W, Butler EN, Sun H et al.: Cross-reactive antibody response to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N Engl J Med* 2009;361:1945-52
- [9] Xing ZZ, Cardona CJ: Preexisting Immunity to Pandemic (H1N1) 2009. *Emerging Infectious Diseases* 2010; 15(11): 1847-9
- [10] Greenberg ME, Lai MH, Hartel GF, Wichems CH, Gittleson C, Bennet J, Dawson G, Hu W, Leggio C, Washington D, Basser RL: Response to a Monovalent 2009 influenza A (H1N1) Vaccine. *N Engl J Med* 2009;361(25):2405-13
- [11] Ikonen N, Strengell M, Kinnunen L, Österlund P, Pirhonen J, Broman M, Davidkin I, Ziegler T, Julkunen I: High frequency of cross-reacting antibodies against 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus among the elderly in Finland. *Euro Surveill* 2010;15(5):pii=19478
- [12] Miller E, Hoschler K, PHardelid P, Stanford E, NAndrews N, Zambon M (2010): Incidence of 2009 pandemic influenza A H1N1 infection in England: a cross-sectional serological study. *Lancet*; Early Online Publication, 21 January 2010 [doi:10.1016/S0140-6736(09)62126-7]
- [13] Adamson WE, Maddi S, Robertson C, McDonagh S, Molyneaux PJ, Templeton KE, Carman WF: 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus in Scotland: geographically variable immunity in Spring 2010, following the winter outbreak. *Euro Surveill* 2010; 15(24):pii=19590
- [14] Kyriakis CS, Olsen CW, Carman S, Brown IH, Brookes SM, van Doorselaere J, van Reeth K (2010): Serologic Cross-Reactivity with Pandemic (H1N1) 2009 Virus in Pigs, Europe. *Emerg Inf Dis* 2010;16(1):96-9
- [15] Krause JC, Tumpey TM, Huffman CJ, McGraw PA, Pearce MB, Tsibane T, Hai R, Basler CF, Crowe JE: Naturally Occurring Human Monoclonal Antibodies Neutralize both 1918 and 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Viruses. *J Virol* 2010;84(6):3127-30
- [16] Wei C-J, Boyington JC, Dai K, Houser KV, Pearce MB, Kong W-P, Yang Z-Y, Tumpey TM, Nabel GJ: Cross-Neutralization of 1918 and 2009 Influenza Viruses: Role of Glycans in Viral Evolution and Vaccine Design. *Sci Transl Med* 2010;2(24): 24ra21
- [17] Rui Xu R, Ekiert DC, Krause JC, Rong Hai R, Crowe JE, Wilson IA: Structural Basis of Preexisting Immunity to the 2009 H1N1 Pandemic Influenza Virus. *Science* 2010 (published online March 25, 2010) [doi:10.1126/science.1186430]
- [18] Rizzo C, Rota MC, Bella A, Alfonsi V, Declich S, Caporali MG, Ranghiasi A, Lapini G, Piccirella S, Salmaso S, Montomoli E: Cross-reactive antibody responses to the 2009 A/H1N1v influenza virus in the Italian population in the pre-pandemic period. *Vaccine* 2010;28(20):3558-62
- [19] World Health Organization (WHO): Seroepidemiological studies of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus. *Weekly Epidemic Rec* 2010; 85(24):229-236
- [20] Allwinn R, Geiler J, Berger A, Cinatl J, Doerr HW: Determination of serum antibodies against swine-origin influenza A virus H1N1/09 by immunofluorescence, haemagglutination inhibition, and by neutralization tests: how is the prevalence rate of protecting antibodies in humans? *Med Microbiol Immunol* 2010;199(2):117-21

- [21] Chen H, Wang Y, Liu W, Zhang J, Dong B, Fan X, de Jong MD, Farrar J, Riley S, Smith GJD, Guan Y: Serologic Survey of Pandemic (H1N1) 2009 Virus, Guangxi Province, China. *Emerging Infectious Diseases* 2010; 15(11): 1849-50
- [22] Chan YJ, Lee CL, Hwang SJ, Fung CP, Wang FD, Yen DH, Tsai CH, Chen YM, Lee SD: Seroprevalence of antibodies to pandemic (H1N1) 2009 influenza virus among hospital staff in a medical center in Taiwan. *J Chin Med Assoc* 2010; 73(2):62-6
- [23] Chen MIC, Lee VJM, Lim W-Y, Barr IG, Lin RTP, Koh GCH, Yap J, Cui L, Cook AR, Laurie K, Tan LWL, Huan Tan B, Loh J, Shaw R, Durrant C, Chow VTK, Kelso A, Seng Chia K, Sin Leo Y: 2009 Influenza A(H1N1) Seroconversion Rates and Risk Factors Among Distinct Adult Cohorts in Singapore. *JAMA* 2010;303(14):1383-91
- [24] Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, Muramoto Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Noda T, Sakabe S, Imai M, Hatta Y, Watanabe S, Li C, Yamada S et al.: In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 2009;460(7258):1021-5
- [25] McCullers JA, van de Velde L-A, Allison KJ, Branum KC, Webby RJ, Flynn PM: Recipients of Vaccine against the 1976 "Swine Flu" Have Enhanced Neutralization Responses to the 2009 Novel H1N1 Influenza Virus. *Clin Inf Dis* 2010;50:1487-92
- [26] Amt für Statistik Berlin Brandenburg: Bevölkerung von Berlin (Stand: 31.12.2008). Statistischer Bericht A I 3 – j / 08 (Oktober 2009). Link: <http://www.statistik-berlin-brandenburg.de/>
- [27] Kassenärztliche Vereinigung Berlin, Arztsuche. Link: <http://www.kvberlin.de/60arztsuche/index.html>
- [28] Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten bei Menschen (Infektionsschutzgesetz – IfSG). Infektionsschutzgesetz vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045), das zuletzt durch Artikel 2a des Gesetzes vom 17. Juli 2009 (BGBl. I S. 2091) geändert worden ist. Link: <http://bundesrecht.juris.de/ifsg/index.html>