

Aus der Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten, Sektion Nephrologie, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II, Universitätsmedizin Rostock, Deutschland

Thema:

Über die Verbreitung des Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)-Virus und der Zeckenparalyse in Mecklenburg-Vorpommern

Tick-borne encephalitis (TBE) virus and tick paralysis in Mecklenburg-Western Pomerania

Habilitationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae habilitatus (Dr. med. habil.)

der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Vorgelegt von Dr. med. univ. Silvius Frimmel

Geb. am 03.08.1977 in Wien

Rostock, 2020

Gutachter:

Univ.-Prof. Dr.med.univ. Emil Reisinger; Universitätsmedizin Rostock, Zentrum für Innere Medizin

Univ.-Prof. Dr.med.univ. Robert Krause, Medizinische Universität Graz, Abteilung für Innere Medizin

Univ.-Prof. Dr. med. Frank Hufert, Medizinische Hochschule Brandenburg, Institut für Mikrobiologie

Jahr der Einreichung: 2020

Jahr der Verteidigung: 2021

Inhalt

Einleitung.....	4
Material und Methoden.....	7
Enzyme Linked Immuno Assay (ELISA)	9
Virusneutralisationstest (NT).....	9
Ergebnisse und Diskussion	10
FSME in Menschen und Zecken.....	10
FSMEV in Zecken	11
FSMEV bei Wildtieren.....	13
FSMEV bei Nutztieren.....	14
Zeckenparalyse.....	15
Abbildung 1.	18
Literatur.....	19
ORIGINALARBEITEN	24
Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus bei Menschen und Zecken in Mecklenburg-Vorpommern.	24
Tick-borne encephalitis virus habitats in North East Germany: reemergence of TBEV in ticks after 15 years of inactivity.	29
Seroprevalence of tick-borne-encephalitis virus in wild game in Mecklenburg-Western Pomerania (north-eastern Germany).	35
Detection of tick-borne encephalitis virus antibodies in sera of sheep and goats in Mecklenburg- Western Pomerania (north-eastern Germany).....	40
Abducens nerve palsy following a tick bite: a case report.....	45
ORIGINALPUBLIKATIONEN MIT IMPACT FACTOR.....	48
ORIGNIALPUBLIKATIONEN OHNE IMPACT FACTOR	50
KONGRESSBEITRÄGE, POSTER, ABSTRACTS (Auswahl)	51
VORTRÄGE (AUSWAHL).....	52
PEER REVIEWS (AUSWAHL):	53
LEHRTÄTIGKEIT.....	54
TEILNAHME AN KURSEN ZUR HOCHSCHULDIDAKTISCHEN WEITERBILDUNG	54

Einleitung

Die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) ist die am weitesten verbreitete durch Arthropoden übertragene Viruserkrankung in Mitteleuropa. Das FSME-Virus (FSMEV) gehört zur Gattung Flavivirus (Fam. Flaviviridae) und hat drei verschiedene Subtypen. Der in Deutschland vorkommende zentraleuropäische Subtyp wird meist durch die Zecke *Ixodes ricinus* (Holzbock), der fernöstliche und der sibirische Subtyp am häufigsten von der Zecke *Ixodes persulcatus* (Taigazecke) übertragen [Süss et al., 2011].

Die Inkubationszeit der FSME beträgt wenige Tage bis maximal vier Wochen (in der Regel 7–14 Tage). Die Erkrankung verläuft in zwei Phasen. In etwa 30 Prozent der Fälle kommt es in der ersten Phase zu grippeartigen Symptomen, wie Fieber, Kopf-, Hals- und Bauchschmerzen. Nach einem beschwerdefreien Intervall von wenigen Tagen treten in einer zweiten Krankheitsphase bei etwa 70% der Erkrankten eine Meningitis, Meningoenzephalitis oder Meningoenzephalomyelitis mit plötzlich einsetzenden heftigen Kopfschmerzen und Müdigkeit auf. Lähmungen bis hin zu Para- oder Tetraplegien und Hirnnervenparesen können folgen. Typisch für die FSME sind neben Bewusstseinsstörungen eine Stand- und Gangataxie, fokale und generalisierte Anfälle, ein Intentionstremor sowie seltener extrapyramidale Symptome wie Rigor, Hypokinese und Bradydiadochokinese. Nach ein bis drei Wochen kommt es zur Ausheilung. Bleibende Residualschäden wie Paresen oder Ataxie werden bei bis zu 30% der schweren Verläufe beschrieben. Die Tendenz zu schweren Verläufen steigt mit zunehmendem Lebensalter [Dumpis et al., 1999; Kaiser 2000, 2005]. Dem Gesundheitsamt muss gemäß dem Infektionsschutzgesetz der direkte oder indirekte Nachweis des FSME-Virus, soweit er auf eine akute Infektion hinweist, namentlich gemeldet werden.

Die aktive Immunisierung stellt einen wirksamen Schutz gegen die FSME für potenziell gefährdete Einwohner und Besucher von Risikogebieten dar. Für einen kompletten Impfschutz sind drei Impfungen erforderlich – eine Grundimmunisierung, bestehend aus zwei Teilimmunisierungen sowie einer Boosterung. Auffrischimpfungen sind je nach Empfehlung nach drei bis fünf Jahren erforderlich. Nach der FSME-Impfung oder nach durchgemachter Infektion besteht eine Kreuzimmunität gegen alle drei Subtypen [Süss, et al. 2004, Heinz, et al. 2013].

Das Virus zirkuliert in der Natur zwischen den Zecken als Vektoren und ihren Wirten in geografisch eng begrenzten natürlichen Herden [Dobler et al., 2011]. Zecken ernähren sich vom Blut verschiedener Wirte, entsprechend ihrer Lebensphase. Larven saugen hauptsächlich an kleinen Nagetieren, während Nymphen mittelgroße Tiere wie Igel, Hasen, Vögel oder Eichhörnchen bevorzugen. Adulte Zecken saugen an großen Tieren wie Wildschweinen und Rehen, sowie an Haustieren wie Rindern, Ziegen und Schafen. Diese großen Säugetiere sind wichtige Wirte, um die Zeckenpopulation zu erhalten [Süss et al., 2011; Klaus et al., 2012; Balling et al., 2014; Kríz et al. 2014; Balling et al., 2015; Mlera et al. 2018]. Wild- und Haustiere entwickeln in der Regel nach Infektion mit dem FSMEV spezifische Antikörper ohne zu erkranken. Diese Tiere sind nur für sehr kurze Zeit virämisch, da die Antikörper aber über einen längeren Zeitraum bestehen, sind sie nützliche Indikatortiere für das Vorkommen des FSMEV [Nosek et al., 1967; Gerth et al., 1995; Juceviciene et al., 2005; Klaus et al., 2012; Balling et al., 2014; Duscher et al., 2015; Imhoff et al., 2015; Frimmel et al. 2016, 2019].

Das FSMEV kann neben Zeckenstichen auch alimentär, z.B. durch den Verzehr von unpasteurisierter Milch oder Milchprodukten infizierter Haustiere wie Ziegen, Schafe oder Kühe übertragen werden. Produkte aus unpasteurisierter Ziegen-, Schaf- und Kuhmilch wurden in der Vergangenheit regelmäßig als Quelle für Infektionen und Ausbrüche von FSME identifiziert. Solche Nahrungsmittel-assoziierte Ausbrüche werden immer noch aus vielen europäischen Ländern gemeldet [Apitzsch 1967, Holzmann et al. 2009; Kríz et al., 2009; Cisak et al., 2010; Hudopisk et al., 2013; Dorko et al., 2014; Imhoff et al., 2015; Markovinović et al., 2016; Brockmann et al., 2018; Kerlik et al., 2018].

Die Inzidenz der FSME hat in Europa in den letzten Jahrzehnten zugenommen, gleichzeitig wurden Änderungen der räumlichen Verteilung von FSME-Fällen beobachtet [Skarpaas et al. 2004; Zeman et al. 2004; Jaenson et al., 2012, Süss et al., 2011; Heinz et al. 2015; Graaf et al., 2016; Inci et al., 2016; Jahfari et al., 2017; Beauté et al., 2018; Daniel et al., 2018; Velay et al., 2018]. Die Inzidenz der FSME hängt hauptsächlich von der Dichte der infizierten und suchenden Zecken und der Exposition gegenüber den Zecken ab. Die Folgen der Klimaerwärmung mit milden Wintern spielen vermutlich ebenfalls eine Rolle bei der Zunahme der FSME-Verbreitung. Eine erhöhte Impfrate der Bewohner und Reisenden in

Endemiegebiete kann die Zahl der Fälle beim Menschen verringern, während Naturherde aktiv bleiben. Daher spiegelt die bezirksweite Inzidenz das FSME-Risiko in einem kleineren Maßstab möglicherweise nicht angemessen wider [Hemmer et al. 2007, 2018; Sumilo et al. 2008; Heinz et al., 2013; Daniel et al., 2018; Robert-Koch-Institut, 2019].

Im Jahr 2018 wurden in Deutschland 583 FSME-Fälle an das Robert-Koch-Institut (RKI) gemeldet. Dies entspricht einer Steigerung von 20% gegenüber dem Vorjahr (486 Fälle) und der höchsten Fallzahl seit Einführung der Meldepflicht nach neuer Falldefinition 2001. 161 Kreise wurden als Risikogebiete für eine FSME-Infektion nach Definition des RKIs ausgewiesen. Unter den fünf neuen Risikokreisen ist das Emsland der bisher am nördlichsten gelegene Landkreis und der erste in Niedersachsen [Robert-Koch-Institut, 2019].

In Mecklenburg-Vorpommern, einer der beliebtesten Urlaubsregion Deutschlands, existiert gemäß der Definition des Robert-Koch-Institutes kein FSME-Risikogebiet. In den 60er und 70er Jahren des 20. Jahrhunderts waren aktive FSME-Herde in Mecklenburg-Vorpommern bekannt, und es wurde regelmäßig über menschliche Fälle und Ausbrüche der Erkrankung berichtet [Apitzsch 1965, 1967; Süss et al., 1992]. Einige autochthone Fälle sowie der Nachweis von FSME-RNA in Zecken haben in der Vergangenheit eine Aktivität des Virus in natürlichen Herden gezeigt. Im Jahr 2004 wurde der erste autochthone Fall einer humanen FSME-Infektion seit 19 Jahren gemeldet, gefolgt von zwei weiteren autochthonen Fällen beim Menschen 2005 und 2006 [Hemmer et al., 2004, Frimmel et al., 2010]. Der letzte autochthone Fall vor 2004 wurde 1986 berichtet, der letzte Nachweis des FSMEV aus Zecken stammte aus den Jahren 1992–1993. Zwischen 1993 und 2004 wurden insgesamt 16089 Zecken in Mecklenburg-Vorpommern negativ auf FSME getestet, und es wurden keine weiteren Fälle gemeldet (unveröffentlichte Daten des Landesamtes für Gesundheit und Soziales, MV), sodass Mecklenburg-Vorpommern als frei von FSME galt.

Für die Abschätzung des FSME-Infektionsrisikos in Regionen mit geringer FSME-Prävalenz sind Indikatortiere von besonderem Interesse, da die etablierte Methode zur Erkennung von Naturherden, das Sammeln und Untersuchen von Zecken zeitaufwändig, teuer und oft nicht ausreichend effektiv ist [Klaus et al., 2012; Balling et al., 2014; Imhoff et al., 2015; Frimmel et al., 2016; Grzybek et al., 2018]. FSMEV-spezifische Antikörper können bei Wild- und

Nutztieren durch ELISA und NT zuverlässig über mehrere Jahre im Serum nachgewiesen werden [Cisak et al., 2010; Klaus et al., 2010; 2012; 2014; Imhoff et al., 2015; Frimmel et al. 2016, 2019].

Die Zeckenparalyse stellt eine seltene neurologische Erkrankung dar, die durch Neurotoxine der Speicheldrüsen von Zecken ausgelöst wird. Andererseits ist die Erkrankung das häufigste durch Toxine von Zecken (Spinnentiere) verursachte veterinär- und humanmedizinische Krankheitsbild. Die ersten Symptome der Zeckenparalyse sind Reizbarkeit, Müdigkeit, Schmerzen, Parästhesie oder ataktischer Gang. Ohne Entfernung der Zecke kommt es zu einer symmetrischen, schlaffen aufsteigenden Parese innerhalb von 12 bis 24 Stunden. Weiterhin kann es zu einer Bulbärparalyse mit Dysarthrie, Dysphagie sowie Gesichtsmuskel-, oder Augenmuskellähmung kommen [Rose, 1954; Grattan-Smith et al., 1997; Dworkin et al., 1999; Torres und Schlossberg, 2000; Miller, 2002; Vedanarayanan et al., 2002, 2004; Mans et al., 2003].

Ziel der Arbeit war es, das Vorkommen von FSME und die seltene Differentialdiagnose, die Zeckenparalyse, in Mecklenburg-Vorpommern näher zu beschreiben. Durch Beschreibung von humanen autochthonen Fällen, Untersuchungen von suchenden und vollgesogenen Zecken auf FSMEV-RNA, sowie Untersuchungen der Seren von Wildtieren und Nutztieren aus Mecklenburg-Vorpommern auf FSMEV-Antikörper, sollten Gebiete mit einem möglichen Risiko der FSME-Übertragung identifiziert werden.

Material und Methoden

In jeder Region, in der 2004–2006 ein autochthoner Fall von FSME gemeldet wurde, in Groß Quassow am Woblitzsee, Boldekow nahe Anklam, sowie Thiessow auf Rügen (Abb.1.), wurden nüchterne Nymphen gesammelt. Je 50 Nymphen pro Region wurden einzeln bei minus 80°C eingefroren und danach, wie unten beschrieben, aufgearbeitet. Weitere 50 Nymphen aus jeder Region wurden zur Blutmahlzeit an immunkompetente NMRI (Naval Medical Research Institute)-Mäuse angesetzt. Von diesen wurden je zehn Nymphen in einer Kammer auf dem Rücken einer Maus fixiert. Dieses Vorgehen wurde gewählt, da gezeigt

werden konnte, dass FSME-RNA in vollgesogenen Zecken häufiger zu detektieren ist, und da „cofeeding“, also gleichzeitiges Saugen mehrerer Zecken an einer Stelle, die Übertragung von FSME begünstigt [Labuda et al., 1993; Süss et al., 2006]. Zur Kontrolle wurden je 50 ungesogene Nymphen untersucht. Nach fünf Tagen wurden die lebenden und vollgesogenen Zecken mit Pinzetten entfernt, einzeln bei minus 80°C eingefroren und danach wie unten beschrieben aufgearbeitet.

Jede Zecke wurde mit Micropistills (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in 200 µl steriler 0,9 %-iger Kochsalz Lösung in einem 1,5 ml-Tube homogenisiert (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem DNeasy® blood and tissue kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend den Anweisungen des Herstellers, ohne RNase zuzufügen, um gleichzeitig RNA und DNA für weitere Studien zu isolieren. Nach Isolation wurde eine nested RT-PCR mit den Primern Pp1 (5'-GCG-TTT-GCT-TCG-GAC-AGC-ATT AGC-3) und Pm1 (5'-GCG-TCT-TCG-TTG-CGG-TCT-CTT TCG-3) und Pp2 (5'-TCG-GAC-AGC-ATT-AGC-AGC-GGT TGG-3) und Pm2 (5'-TGC-GGT-CTC-TTT-CGA-CAC-TCG TCG-3) durchgeführt [Schrader et al., 1999]. 5 µl jedes positiven PCR-Ergebnisses wurden auf ein 1%-iges Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Gel aufgetragen und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Die Konzentration des DNA Amplifikates wurde mit GeneQuant II gemessen (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) und die amplifizierte DNA wurde sequenziert (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland). Die DNA-Sequenzanalyse wurde mittels BLAST®-Version 2.2.18 (National Center of Biotechnology and Information, Bethesda, MD, USA) und MEGA 4.0 (Center for Evolutionary und Functional Genomics, Tempe, AZ, USA) durchgeführt. Die FSMEV-Sequenzen Neudoerfl (U27495.1), Salem (FJ572210.1), Hypr (U39292.1) und Toro-2003 (DQ401140.2) wurden als Referenz verwendet. Mit dem Programm CLC Main Workbench Version 5.0 (CLC Bio, Aarhus, Dänemark) wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt und ein phylogenetischer Baum wurde mittels Neighbourhood-joining-Methode erstellt.

Für die Untersuchungen der Wildtiere wurden insgesamt 359 Seren untersucht – 229 von Schwarzwild, sowie 51 von Rotwild, 24 Seren von Rehwild und 55 Seren von Damwild. Die Seren stammen von Tieren, die 2012 in Mecklenburg-Vorpommern geschossen wurden. Im Rahmen von gesetzlich vorgeschriebenen veterinärmedizinischen Untersuchungen wurden

diese Blutproben im Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei (LALLF) Mecklenburg-Vorpommern aufgearbeitet und asserviert.

Von Nutztieren wurden 479 Seren untersucht, 375 von Schafen und 104 Seren von Ziegen. Die Seren stammen aus 18 Betrieben in Mecklenburg-Vorpommern und wurden zwischen 2014 und 2017 gewonnen. Die Proben stammen von Standorten mit räumlicher Nähe zu Orten mit Nachweisen menschlicher Fälle von FSME oder FSMEV-positiver Zecken, sowie seropositiver Wildtiere. Die Blutproben wurden von örtlichen Tierärzten für Routineuntersuchungen im Rahmen der Tierseuchenüberwachung an das LALLF versandt.

Enzyme Linked Immuno Assay (ELISA)

Alle Serumproben wurden unter Verwendung des "Immunozytm FSME IgG All Species ELISA Kit®" (Progen, Heidelberg, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers getestet. Die Ergebnisse wurden mit Vienna Units per ml (VIEU/ml) ausgedrückt, wobei <63 VIEU/ml als negativ, zwischen 63 und 126 VIEU/ml als grenzwertig und über 126 VIEU/ml als positiv gemäß den Empfehlungen des Herstellers gewertet wurden.

Virusneutralisationstest (NT)

Als Goldstandard zum Nachweis positiver Seren und zum Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse wurde ein Virus-NT als Kontrolle an den im ELISA grenzwertig (borderline) und positiv getesteten Seren durchgeführt. Zusätzlich wurde der NT an zufällig ausgewählten Seren durchgeführt, die im ELISA negativ getestet worden waren. Der Virusneutralisationstest wurde unter Verwendung von Baby-Hamster-Kidney (BHK) -Zellen und FSMEV (Stamm Neudoerfl), wie zuvor beschrieben, durchgeführt [Stiasny et al., 2009]. Hitzeinaktivierte Serumproben wurden 1 h bei 37 ° C mit FSMEV inkubiert. Zellen wurden zugegeben und die Inkubation wurde drei Tage fortgesetzt. Das Vorhandensein von Viren im Zellkulturüberstand wurde durch einen Sandwich-ELISA nachgewiesen, wie zuvor beschrieben [Stiasny et al., 2009]. NT-Titer ≥ 10 wurden als positiv gewertet.

Ergebnisse und Diskussion

FSME in Menschen und Zecken

Alle drei zwischen 2004 und 2006 in Mecklenburg-Vorpommern erkrankten Personen waren mindestens 4 Monate vor Beginn der Erkrankung nicht verreist, sodass bei einer Inkubationszeit von maximal 4 Wochen eine importierte FSME ausgeschlossen werden konnte. Zwei von drei Patienten hatten Fieber bis 40°C, alle Patienten hatten typische neurologische Symptome, wie quantitative und qualitative Bewusstseinsstörungen.

Fall 1

Der erste Patient erkrankte neun Tage nach einem Zeckenstich, den er an einem Campingplatz am Woblitzsee (Abb. 1.) bemerkt hatte, mit Fieber und Kopfschmerzen für drei Tage. Nach einem symptomfreien Intervall wurde er drei Wochen nach dem Stich mit Fieber, Somnolenz, verwaschener Sprache, verlangsamter Feinmotorik und einer ungerichteten Fallneigung stationär aufgenommen. Die Liquordiagnostik ergab eine diskrete Pleozytose, eine Eiweißerhöhung und liquorständige IgM-Produktion. FSME-IgM- und IgG-Antikörper waren im Serum und im Liquor positiv (ELISA). Nach langsamem Rückgang der Symptomatik war der Patient 44 Tage nach dem Zeckenstich wieder vollständig genesen.

Fall 2

Im November 2005 wurde eine 69-jährige Frau aufgrund einer zeitweiligen Desorientiertheit mit diffuser Schwindelsymptomatik und Bewusstseinsstörungen in das Krankenhaus eingewiesen. Mehrere Zeckenstiche waren auf einem Zeltplatz in Thiessow auf Rügen erinnerlich (Abb. 1), wo die Patientin Dauercamperin ist. In der Woche vor der stationären Aufnahme klagte die Patientin über diffuse, dumpf-drückende Kopfschmerzen, Husten und ein allgemeines Krankheitsgefühl. Bei Aufnahme zeigte sich eine Leukozytose im peripheren Blut und eine geringfügige Eiweißerhöhung des Liquors mit einer leichtgradigen Schrankenstörung. FSME-IgM und -IgG-Antikörper konnten im Serum nachgewiesen werden.

Im weiteren Verlauf normalisierte sich der psychische Zustand der Patientin und sie konnte nach neun Tagen ohne neurologische Defizite nach Hause entlassen werden.

Fall 3

Ein 76-jähriger Patient wurde Ende Juni 2006 wegen rezidivierenden Fiebers bis 40°C, Kopfschmerzen, Somnolenz, Kreislaufdysregulation und Tetraparese stationär aufgenommen. Er war Anfang Juni in der Nähe von Boldekow (Abb. 1.) im Landkreis Ostvorpommern von einer Zecke gestochen worden. Der Liquor zeigte eine geringgradige Eiweißerhöhung, FSME-IgM und -IgG-Antikörper wurden im Serum nachgewiesen. Nach 17 Tagen im Akutkrankenhaus erfolgte die Verlegung in ein neurologisches Rehabilitationszentrum, von wo der Patient nach zwei Monaten bei voller Mobilität und Selbständigkeit, mit lediglich diskretem feinmotorischem Defizit, entlassen wurde.

FSMEV in Zecken

Sechs von 250 (2,4 %) Nymphen waren in der FSME-PCR positiv. Aus Groß Quassow am Woblitzsee waren drei von 50 (6 %) der nüchternen und eine von 27 (3,7 %) der gesogenen Nymphen positiv. Aus Thiessow war eine von 50 (2 %) der nüchternen und eine von 39 (2,6 %) der gesogenen Nymphen positiv. Aus der Region Boldekow war keine der Zecken positiv (Abb. 1.). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Infektionsraten von gesogenen und nüchternen Zecken ($p > 0,05$).

Die Sequenzen wiesen eine Homologie von 91–98 % für den Neudoerfl-Stamm des europäischen FSME-Subtyps auf. Die phylogenetische Analyse ergab weiterhin eine nahe Verwandtschaft aller sechs positiven Sequenzen zu einer FSME-Virus-Sequenz (IZ11 / 92) die 1992 aus Mecklenburg-Vorpommern isoliert wurde [Süß et al., 1997].

Da in Mecklenburg-Vorpommern seit 1985 keine FSME Infektionen beim Menschen aufgetreten waren und von 1992 bis 2004 keine FSME Viren in mehr als 16.000 Zecken gefunden wurden, galt Mecklenburg-Vorpommern als FSME frei [Landesamt für Gesundheit und Soziales, Mecklenburg-Vorpommern, unveröffentlichte Daten]. Das erneute Auftreten

von autochthonen FSME-Erkrankungen bei Menschen in Mecklenburg-Vorpommern nach 19 Jahren zeigt, dass FSME-Herde auch nach vielen Jahren nicht erlöschen oder erneut von infizierten Zecken besiedelt werden. Möglicherweise ist in den Jahren zuvor bei Meningoenzephalitiden die FSME differentialdiagnostisch nicht berücksichtigt und so übersehen worden. Der Nachweis des FSME Virus in Zecken aus zwei der drei Waldgebiete, in denen 2004 und 2005 auch humane Fälle von FSME aufgetreten waren, lässt ein ähnlich fokales Vorkommen von FSME in Naturherden vermuten, wie es aus Risikogebieten beschrieben wird.

Der erste Nachweis des FSME-Virus in Zecken in Mecklenburg-Vorpommern seit 15 Jahren könnte durch die wärmeren Wintertemperaturen erklärt werden, die eine höhere Aktivität der Zecken und so eine höhere Anzahl von Zeckenstich-Expositionen bedingen [Dautel et al., 2008, Hemmer et al., 2007; Kahl 1996; Lindgren et al., 2001]. Der Winter 2006/2007 war bis dahin der wärmste Winter in Deutschland seit der Einführung der jährlichen Temperaturstatistik 1901. In Mecklenburg-Vorpommern wurde eine durchschnittliche Temperatur von 4,6° C und damit 4,4°C über dem langjährigen Durchschnitt gemessen [Kirsche et al., 2007]. Mit der Klimaerwärmung, aus der unter anderem mildere Winter in unserer Breiten resultieren, verbessern sich die Wachstumsbedingungen für Mücken und Zecken. Darüber hinaus verstärkt sich auch deren Fähigkeit, Infektionskrankheiten wie die FSME zu übertragen. Ansteigende Wintertemperaturen können die Ausbreitung von Ixodes-Arten und die Verbreitung von FSME in Mittel- und Nordeuropa begünstigen. Die Nagerpopulationen, ein wichtiges Reservoir der FSME-Viren, werden durch Feuchtigkeit beeinflusst (verstärktes Populationswachstum bei Feuchtigkeit, häufigeres Aufsuchen menschlicher Siedlungen bei Trockenheit) [Hemmer et al., 2007, 2018]. In Schweden ist *Ixodes ricinus* – parallel zum Anstieg der Wintertemperaturen – in den letzten 50 Jahren bis auf 66° nördlicher Breite vorgedrungen. Gleichzeitig wurde dort ein Anstieg der Fallzahlen von FSME und Lyme-Borreliose beobachtet [Jaenson et al., 2012]. In Deutschland ist aufgrund der wärmeren und feuchteren Winter ein weiteres Ansteigen der Population von *Ixodes ricinus* und der Fallzahlen von FSME und Lyme-Borreliose möglich. 2018 war das Jahr mit der höchsten Fallzahl an gemeldeten FSME-Erkrankungen seit Beginn der Meldepflicht [RKI 2019].

Der fehlende Nachweis von FSME in mehr als 16000 Zecken von 1992 bis 2004 kann möglicherweise auch dadurch erklärt werden, dass das Virus fokal auftritt und die Sammelgebiete diese streng umschriebenen, z.T. sehr kleinen Herdgebiete, nicht umfassten. Auch durch die weit verbreitete Praxis der Untersuchung von Pools von 3 bis 10 adulten Zecken oder von bis zu 200 Nymphen kann sich die RNA-Konzentration unter die Nachweisgrenze verdünnen. Besonders in Regionen mit niedriger FSME-Virus-Prävalenz können so negative Ergebnisse vorgetäuscht werden. Daher wurden alle Nymphen in unserer Studie einzeln aufgearbeitet.

FSMEV bei Wildtieren

13 von 359 Seren von Wildtieren wurden mittels ELISA positiv oder grenzwertig auf FSME-IgG getestet (3,6%). Vier von 51 Serumproben von Rotwild, vier von 229 Proben von Wildschweinen und eine von 55 Proben von Damwild waren im ELISA positiv. Zwei Wildschweinseren und je ein Rot- und Damwildserum waren im ELISA grenzwertig. Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse wurde ein NT an den neun positiven Seren, den vier grenzwertigen Seren und zusätzlich an fünf zufällig ausgewählten negativen Seren durchgeführt. Vier Proben wurden mittels NT positiv getestet. Jeweils ein Rotwild- und Damwildserum aus Zingst/Darss im Landkreis Vorpommern/Rügen, sowie ein Rehwild und ein Rotwildserum aus dem Landkreis Vorpommern-Greifswald waren positiv im NT (Abb. 1).

Von 1986 bis 1989 wurden auf der Insel Usedom (im Osten Vorpommerns) 5 von 500 Serumproben von Wildschweinen und Rotwild und 1988 5 von 15 Rothirschen positiv für das FSMEV-Antikörper getestet [Kahl und Radda, 1988; Süss et al., 1992]. Eine Seroprävalenzstudie an Wildtieren in Sachsen hat gezeigt, dass eine relativ hohe Seroprävalenz zwischen 10% und 23% von FSMEV in Wildtieren in Gebieten mit niedrigem FSMEV-Übertragungsrisiko zu finden war. Die deutlich höhere Seroprävalenz in der genannten Studie lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass Tiere in Kreisen, die an Riskigebiete grenzen, untersucht wurden [Robert Koch-Institut 2007; Balling et al., 2014].

Der erneute Nachweis von FSMEV-positiven Wildtieren zeigt, dass durch die serologische Untersuchung von Wildtieren Gebiete mit einem Risiko für FSMEV-Infektionen auch

außerhalb von Risikokreisen nach der fallbezogenen Definition des RKIs detektiert werden können. Insbesondere, da endemische FSME-Herde nur 0,5 km² groß sein können [Dobler et al., 2011], während die Kreisgröße variieren und sich durch Verwaltungsreformen ändern kann. Die serologische Untersuchung von Wild, Nutztieren und kleinen Nagetieren ist ein vielversprechendes Instrument zur Detektion neuer Gebiete, in denen FSME endemisch ist, insbesondere bei niedriger Prävalenz [Achazi et al., 2011, Balling et al., 2014, Roelandt et al., 2014; Imhoff et al., 2015, Frimmel et al. 2016, 2019].

FSMEV bei Nutztieren

Neun von 375 Serumproben von Schafen (2,4%) und zwei von 104 Proben von Ziegen (1,9%) wurden mittels ELISA grenzwertig getestet. Keines der Seren war im ELISA positiv. Zwei der als grenzwertig getesteten Schafseren wurden im NT positiv getestet. Je eine Serumprobe aus dem Jahr 2014 von einer Herde im Landkreis Mecklenburgische Seenplatte und eine Serumprobe aus dem Landkreis Vorpommern-Greifswald aus dem Jahr 2016 waren positiv (Abb. 1.).

Schafe und Ziegen sind wertvolle Indikatortiere für FSME [Klaus et al., 2012]. Die Anzahl seropositiver Tiere scheint mit der Anzahl positiver Zecken und menschlicher FSME-Fälle in Regionen mit relativ hoher FSME-Prävalenz zu korrelieren [Juceviciene et al., 2005]. Außerdem sind sie durch den größeren und definierten Aktivitätsbereich im Vergleich zu Kleinsäugetieren oder Wild möglicherweise als Indikatoren für Gebiete mit niedriger Endemizität von FSME geeignet [Klaus et al., 2012; Balling et al. 2014; Imhoff et al., 2015]. Die relativ niedrige Rate positiver Seren in unserer Studie kann durch die Beobachtung erklärt werden, dass die Seroprävalenz bei Schafen und Ziegen zwischen einzelnen Herden stark variiert, wobei die höchsten Raten nahe bei bekannten Naturherden des FSME-Virus gefunden wurden [Imhoff et al., 2015].

Die Seroprävalenz des FSMEV bei Wild- und Haustieren wurde in mehreren Studien in der Tschechischen Republik, in Belgien, Kroatien, Rumänien und in weiteren europäischen Ländern untersucht, um mögliche neue Indikatoren für das Infektionsrisiko zu ermitteln, die die aktuelle inzidenzbasierte Risikobewertung ergänzen könnten. So könnten mögliche Risikogebiete für die Übertragung von FSME auch außerhalb bekannter Risikogebiete

identifiziert werden [Gerth et al., 1995; Charrel et al., 2004; Balling et al., 2014; Kriz et al., 2014; Duscher et al., 2015; Imhoff et al., 2015; Tonteri et al., 2016; Salat et al. 2017, Frimmel et al. 2019].

In Mecklenburg-Vorpommern ist das Risiko einer FSMEV-Infektion gering, es treten jedoch einzelne autochthone Fälle auf. Die Existenz aktiver Herde wurde durch den Nachweis von FSMEV-RNA in suchenden Zecken aus den Gebieten, in denen die Infektionen erworben wurden, nachgewiesen [Frimmel et al., 2010]. Die Anzahl der in unserer Studie positiv getesteten Tiere ist im Vergleich zu ähnlichen Untersuchungen relativ gering. Aus Sachsen liegen Seroprävalenzen von 10%-23% bei Wildtieren vor, aus Endemiegebieten in Baden-Württemberg wurde eine Seroprävalenz von 17,2% bei Schafen berichtet [Balling et al., 2014; Klaus et al., 2011]. Die positiven Daten liefern jedoch ein überzeugendes Argument dafür, dass weitere Untersuchungen an Wild- und Nutztieren durchgeführt werden sollten, die eine größere Stichprobenbasis verwenden und auch die westlichen Regionen Mecklenburg-Vorpommerns abdecken.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass auch bei fehlenden klinischen Fällen FSME-Naturherde über Jahrzehnte aktiv bleiben können. Auch in Nicht-Risikogebieten ist die FSME als Differentialdiagnose von Enzephalitiden zu berücksichtigen. Durch die Untersuchungen wird erneut deutlich, dass Endemiegebiete einer viralen Zoonose wie der FSME nur durch Untersuchung aller Teilnehmer an diesem komplexen Geschehen (Erreger, Wirte, Vektoren) hinreichend beschrieben werden können, um dann auf wissenschaftlicher Grundlage Abwehrstrategien zu entwickeln [Süss et al., 2010].

Zeckenparalyse

Kasuistik

Ein 47-jähriger Mann wurde aufgrund von seit zwei Tagen bestehender Doppelbilder, Benommenheit und Gangstörungen stationär aufgenommen. Er habe zwei Tage zuvor eine vollgesogene Zecke vom rechten Scheinbein entfernt, an der Einstichstelle war noch ein Eschar zu sehen. Eine aufgrund der neurologischen Symptomatik durchgeführte kraniale Computertomographie und Magnetresonanztomographie waren unauffällig. Serologische

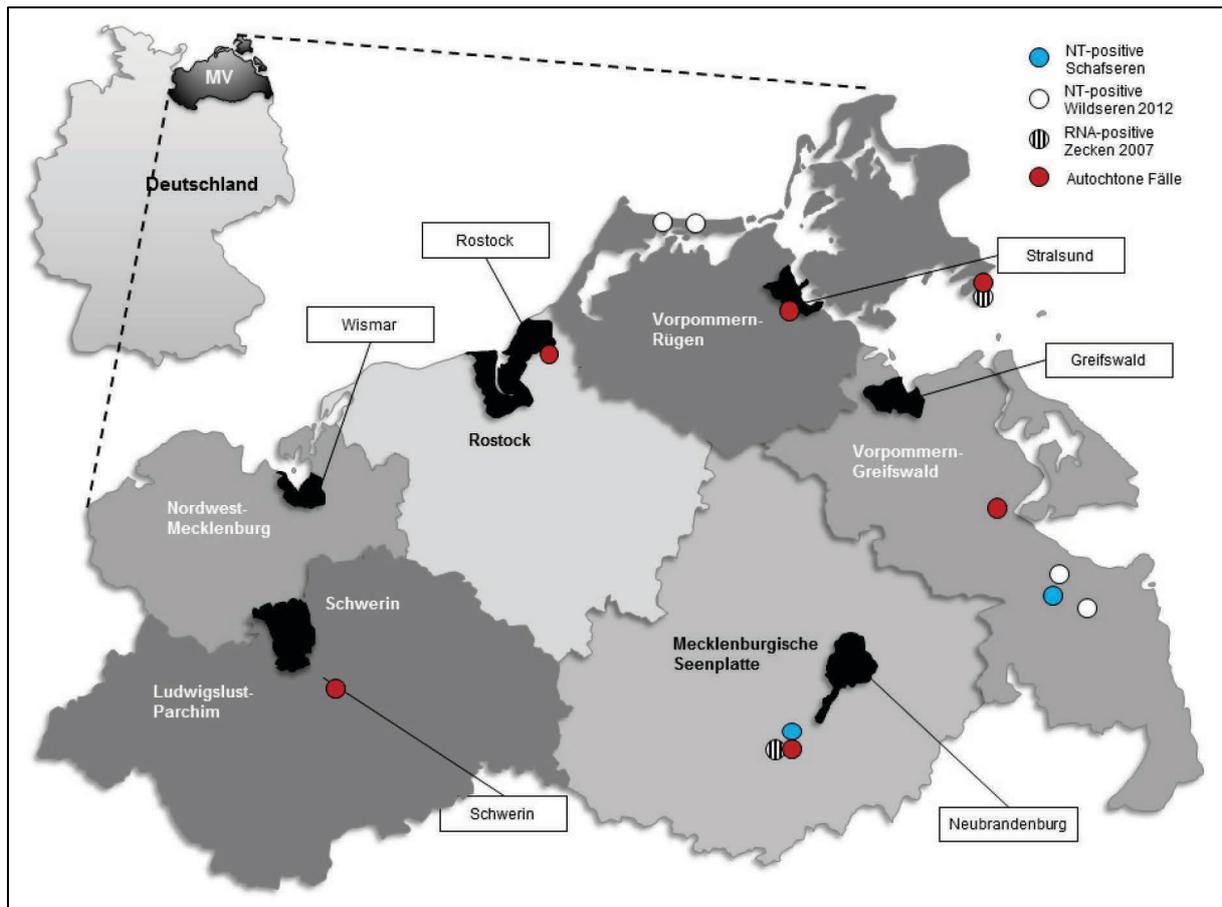
Untersuchungen hinsichtlich FSME, Borreliose, Ehrlichiose und Babesiose blieben negativ. Nach weiteren vier Tagen bildete sich die Symptomatik spontan zurück, und der Patient konnte ohne Residuen entlassen werden.

Außer durch Übertragung von Infektionserkrankungen können Zecken, wie andere Spinnentiere auch, durch Toxine Erkrankungen hervorrufen. Unter diesen Toxin-vermittelten Erkrankungen ist die Zeckenparalyse die klinisch bedeutendste. Sie wird durch ein Neurotoxin der Speicheldrüsen von saugenden Zecken verursacht. Insbesondere in Australien, Südafrika und Nordamerika ist sie als veterinärmedizinisches Krankheitsbild gut bekannt. Von den weltweit etwa 900 bekannten Zeckenspezies, wurden 59 Ixodidae (Schildzecken) und 14 Argasidae (Lederzecken) mit der Zeckenparalyse in Verbindung gebracht [Pienaar R., et al. 2018]. In Nordamerika wird meist die Schildzecke *Dermacentor andersoni* als Verursacher genannt, weitere Spezies, sind unter anderem *Dermacentor variabilis*, *Amblyomma americanum*, *Amblyomma maculatum* und *Ixodes scapularis*. In Australien wird die Mehrzahl der Fälle durch den Biss der Schildzecke *Ixodes holocyclus* verursacht. Dort sind ungefähr 20.000 Haustiere sind jedes Jahr betroffen, menschliche Fälle sind selten. Zwanzig Todesfälle durch Vergiftung von Zecken-Neurotoxinen wurden in Australien vor 1945 gemeldet, und fünf Fälle schwerer Zeckenlähmungen bei Kindern wurden in der Metropolregion Sydney 1972–1995 beschrieben [Rose, 1954; Grattan-Smith et al., 1997; Miller 2002; Dworkin et al., 1999; Torres und Schlossberg, 2000; Vedanarayanan et al., 2002]. In Europa wurden bisher nur sporadisch Fälle der Zeckenparalyse berichtet, wobei die Gattungen *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma* und *Boophilus* mit der Zeckenparalyse assoziiert wurden [Torres und Schlossberg, 2000].

Nach Ausschluss von raumfordernden oder entzündlichen Hirnläsionen mittels MRT, sowie dem serologischen Ausschluss der häufigsten durch Zecken übertragenen Infektionen, erscheint als Ursache der prompt reversiblen neurologische Störung bei dem Patienten eine Zeckentoxin-vermittelte Lähmung wahrscheinlich. In Europa wurde die Zeckenparalyse bisher selten beschrieben und die Inzidenz möglicherweise unterschätzt. Bei passender klinischer Präsentation und fehlendem Nachweis anderer Ursachen sollte dieses seltene Erkrankungsbild in die differentialdiagnostischen Überlegungen bei entsprechender neurologischer Symptomatik nach einem Zeckenstich auch in Europa miteinbezogen werden.

Abbildung 1.

Direkte und indirekte Nachweise des FSMEV in Mecklenburg-Vorpommern seit 2004 [Frimmel et al., 2009, 2016, 2019] .



Literatur

1. Achazi, K., Růžek, D., Donoso-Mantke, O., Schlegel, M., Ali, H.S., Wenk, M., Schmidt-Chanasit, J., Ohlmeyer, L., Rühle, F., Vor, T., Kiffner, C., Kallies, R., Ulrich, R.G., Niedrig, M., 2011. Rodents as Sentinels for the Prevalence of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 11 (6), 641–647. 10.1089/vbz.2010.0236.
2. Apitzsch, L., 1965. Untersuchung über Reservoirre der Zeckenzephalitis und ihre epidemiologische Bedeutung im Herdgebiet „Torgelow“. *Z. ges. Hyg.* 11, 65-74.
3. Apitzsch, L., 1967. Zecken- und Virusaktivität im Herdgebiet von Torgelow in den Jahren 1960 bis 1965. *Z. ges. Hyg.* 13, 261–267.
4. Balling, A., Beer, M., Gniel, D., Pfeffer, M., 2015. Zum Vorkommen von Antikörpern gegen das Frühsommer-Meningoenzephalitis- Virus bei Hunden in Freistaat Sachsen, Deutschland. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 128 (7-8), 297–303.
5. Balling, A., Plessow, U., Beer, M., Pfeffer, M., 2014. Prevalence of antibodies against tick-borne encephalitis virus in wild game from Saxony, Germany. *Ticks and tick-borne diseases* 5 (6), 805–809. 10.1016/j.ttbdis.2014.06.007.
6. Beauté, J., Spiteri, G., Warns-Petit, E., Zeller, H., 2018. Tick-borne encephalitis in Europe, 2012 to 2016. *Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 23 (45). 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.45.1800201.
7. Brockmann, S.O., Oehme, R., Buckenmaier, T., Beer, M., Jeffery-Smith, A., Spannenkrebs, M., Haag-Milz, S., Wagner-Wiening, C., Schlegel, C., Fritz, J., Zange, S., Bestehorn, M., Lindau, A., Hoffmann, D., Tiberi, S., Mackenstedt, U., Dobler, G., 2018. A cluster of two human cases of tick-borne encephalitis (TBE) transmitted by unpasteurised goat milk and cheese in Germany, May 2016. *Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 23 (15). 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.15.17-00336.
8. Charrel, R.N., Attoui, H., Butenko, A.M., et al., 2004. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clinical Microbiology and Infection.* 10, 1040–1055.
9. Cisak, E., Wójcik-Fatla, A., Zajac, V., Sroka, J., Buczek, A., Dutkiewicz, J., 2010. Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in samples of raw milk taken randomly from cows, goats and sheep in eastern Poland. *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM* 17 (2), 283–286.
10. Daniel, M., Danielová, V., Fialová, A., Malý, M., Kříž, B., Nuttall, P.A., 2018. Increased Relative Risk of Tick-Borne Encephalitis in Warmer Weather. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8, 90. 10.3389/fcimb.2018.00090.
11. Dautel, H., Dippel, C., Kämmer, D., Werkhausen, A., Kahl, O., 2008. Winter activity of *Ixodes ricinus* in a Berlin forest. *Int J Med Microbiol.* 298 (S1), 50-54.
12. Dobler, G., Hufert, F., Pfeffer, M., Essbauer, S., 2011. Tick-borne encephalitis: from microfocus to human disease. *progress in parasitology. Parasitol. Res. Monogr.* 2, 323–331.
13. Dorko, E., Rimárová, K., Kizek, P., Stebnický, M., Zákutná, L., 2014. Increasing incidence of tick-borne encephalitis and its importance in the Slovak Republic. *Central European journal of public health* 22 (4), 277–281. 10.21101/cejph.a3939.
14. Dumpis, U., Crook, D., Oksi, J. 1999. Tick-borne encephalitis. *Clin Infect Dis* 28, 882-890.
15. Duscher, G., G., Leschnik, M., Fuehrer, HP., Joachim, A., 2015. Wildlife reservoirs for vector-borne canine, feline and zoonotic infections in Austria. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 4(1), 88-96.

16. Dworkin, M.S., Shoemaker, P.C., Anderson, D.E., 1999. Tick paralysis: 33 human cases in Washington State, 1946–1996. *Clin. Infect. Dis.* 29, 1435–1439.
17. Frimmel, S., Hemmer, C.J., Löbermann, M., Reisinger, E.C., 2009. Klimawandel und Globale Erwärmung. Wegbereiter für die globale Ausbreitung tropischer Infektionskrankheiten? *Klimawandel und Globale Erwärmung. Pharmazie in unserer Zeit* 38 (6), 492–499. 10.1002/pauz.200900335.
18. Frimmel, S., Krienke, A., Riebold, D., Löbermann, M., Littmann, M., Fiedler, K., Klaus, C., Süß, J., Reisinger, E.C., 2010. Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus bei Menschen und Zecken in Mecklenburg-Vorpommern. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 135 (27), 1393–1396. 10.1055/s-0030-1262424.
19. Frimmel, S., Krienke, A., Riebold, D., Loebermann, M., Littmann, M., Fiedler, K., Klaus, C., Süß, J., Reisinger, E.C., 2014. Tick-Borne Encephalitis Virus Habitats in North East Germany: Reemergence of TBEV in Ticks after 15 Years of Inactivity. *BioMed Research International* 2014. 10.1155/2014/308371.
20. Frimmel, S., Leister, M., Löbermann, M., Feldhusen, F., Seelmann, M., Süß, J., Reisinger, E.C., 2016. Seroprevalence of tick-borne-encephalitis virus in wild game in Mecklenburg-Western Pomerania (north-eastern Germany). *Ticks and tick-borne diseases* 7 (6), 1151–1154. 10.1016/j.ttbdis.2016.08.004.
21. Frimmel, S., Löbermann, M., Feldhusen, F., Seelmann, M., Stiasny, K., Süß, J. and Reisinger, E.C., 2019. Detection of tick-borne encephalitis virus antibodies in sera of sheep and goats in Mecklenburg-Western Pomerania (north-eastern Germany). *Ticks Tick Borne Dis. Apr* 14. pii: S1877-959X(19)30068-8. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.04.012.
22. Gerth, H.J., Grimshandl, D., Stage, B., Döller, G., Kunz, C., 1995. Roe deer as sentinels for endemicity of tick-borne encephalitis virus? *Epidemiol. Infect.* 115(2), 355–365.
23. Graaf, J.A. de, Reimerink, J.H.J., Voorn, G.P., Bij de Vaate, E.A., Vries, A. de, Rockx, B., Schuitemaker, A., Hira, V., 2016. First human case of tick-borne encephalitis virus infection acquired in The Netherlands, July 2016. *Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 21 (33). 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.33.30318.
24. Grattan-Smith, P.J., Morris, J.G., Johnston, H.M., Yiannikas, C., Malik, R., Russel, R., Ouvrier, R.A., 1997. Clinical and neurophysiological features of tick paralysis. *Brain* 120, 1975–1987.
25. Grzybek, M., Alsarraf, M., Tołkacz, K., Behnke-Borowczyk, J., Biernat, B., Stańczak, J., Strachecka, A., Guz, L., Szczepaniak, K., Paleolog, J., Behnke, J.M., Bajer, A., 2018. Seroprevalence of TBEV in bank voles from Poland—a long-term approach. *Emerging Microbes & Infections* 7 (1), 145. 10.1038/s41426-018-0149-3.
26. Han, X., Vapalahti, O. Tick-borne encephalitis virus infections in Lithuanian
26. Heinz, F.X., K. Stiasny, H. Holzmann, M. Kundi, W. Sixl, M. Wenk, W. Kainz, A. Essl, and C. Kunz. 2015. Emergence of tick-borne encephalitis in new endemic areas in Austria: 42 years of surveillance. *Euro Surveill* 20.
27. Heinz, F.X., Stiasny, K., Holzmann, H., Grgic-Vitek, M., Kriz, B., Essl, A., Kundi, M., 2013. Vaccination and Tick-borne Encephalitis, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases* 19 (1), 69–76. 10.3201/eid1901.120458.
28. Hemmer, C.J., Frimmel, S., Kinzelbach, R., Gürtler, L., Reisinger, E.C., 2007. Globale Erwärmung: Wegbereiter für tropische Infektionskrankheiten in Deutschland?. *Dtsch Med Wochenschr.* 132, 2583-2589.

29. Hemmer, C.J., Littmann, M., Löbermann, M., Lafrenz, M., Böttcher, T., Reisinger, E.C., 2005. Tickborne meningoencephalitis, first case after 19 years in northeastern Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 633–634.
30. Hemmer, C.J., Emmerich, P., Loebermann, M., Frimmel, S., Reisinger, E.C., 2018[Mosquitoes and Ticks: The Influence of Global Warming in the Transmission of Infectious Diseases in Germany]. *Dtsch Med Wochenschr.* 143(23), 1714-1722.
31. Holzmann, H., Aberle, S., W., Stiasny, K., Werner, P., Mischak, A., Zainer, B., Netzer, M., Koppi, S., Bechter, E., Heinz, F., X., 2009. Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria. *Emerg Infect Dis* 15, 1671-1673.
32. Hudopisk, N., Korva, M., Janet, E., Simetinger, M., Grgič-Vitek, M., Gubenšek, J., Natek, V., Kraigher, A., Strle, F., Avšič-Županc, T., 2013. Tick-borne Encephalitis Associated with Consumption of Raw Goat Milk, Slovenia, 2012. *Emerging Infectious Diseases* 19 (5), 806–808. 10.3201/eid1905.121442.
33. Imhoff, M., Hagedorn, P., Schulze, Y., Hellenbrand, W., Pfeffer, M., Niedrig, M., 2015. Review: Sentinels of tick-borne encephalitis risk. *Ticks and tick-borne diseases* 6 (5), 592–600. 10.1016/j.ttbdis.2015.05.001.
34. Inci, A., Yildirim, A., Duzlu, O., Doganay, M., Aksoy, S., 2016. Tick-Borne Diseases in Turkey: A Review Based on One Health Perspective. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (12). 10.1371/journal.pntd.0005021.
35. Jaenson, T.G.T., Hjertqvist, M., Bergström, T., Lundkvist, Å., 2012. Why is tick-borne encephalitis increasing? A review of the key factors causing the increasing incidence of human TBE in Sweden. *Parasites & Vectors* 5, 184. 10.1186/1756-3305-5-184.
36. Jahfari, S., Vries, A. de, Rijks, J.M., van Gucht, S., Vennema, H., Sprong, H., Rockx, B., 2017. Tick-Borne Encephalitis Virus in Ticks and Roe Deer, The Netherlands. *Emerging Infectious Diseases* 23 (6), 1028–1030. 10.3201/eid2306.161247.
37. Juceviciene, A., Zygutiene, M., Leinikki, P., Brummer-Korvenkontio, H., Salminen, M., Han, X., Vapalahti, O., 2005. Tick-borne encephalitis virus infections in Lithuanian domestic animals and ticks. *Scandinavian journal of infectious diseases* 37 (10), 742–746. 10.1080/00365540510012134.
38. Kahl, R. and Radda, O., 1988. Occurrence of tick-borne encephalitis (TBE) virus in Berlin (West). *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene* 268, 482-486.
39. Kahl, O., 1996. Fatal attraction or how do we get tick bites? *Infection* 24, 394-395.
40. Kaiser, R., 2000. Epidemiologie und Verlauf der Frühsommer-Meningoenzephalitis in Baden-Württemberg zwischen 1994 und 1999. *Dtsch Med Wochenschr.* 125, 1147–1153.
41. Kaiser, R., 2005. Neuroborreliose und Frühsommer–Meningoenzephalitis - Gemeinsamkeiten und Unterschiede. *Fortschr Neurol Psychiat.* 73, 750-764.
42. Kerlik, J., Avdičová, M., Štefkovičová, M., Tarkovská, V., Pántiková Valachová, M., Molčányi, T., Mezencev, R., 2018. Slovakia reports highest occurrence of alimentary tick-borne encephalitis in Europe: Analysis of tick-borne encephalitis outbreaks in Slovakia during 2007-2016. *Travel medicine and infectious disease.* 10.1016/j.tmaid.2018.07.001.
43. Kirsche, U., Lux, G. Deutschlandwetter im Winter 2006/07-wärmster Winter aller Zeiten. DWD. Pressemitteilung 27.02.2007. <http://www.dwd.de>
44. Klaus, C., Hoffmann, B., Beer, M., Müller, W., Stark, B., Bader, W., Stiasny, K., Heinz, F.X., Süss, J., 2010. Seroprevalence of tick-borne encephalitis (TBE) in naturally exposed monkeys (*Macaca sylvanus*) and sheep and prevalence of TBE virus in ticks in a TBE endemic area in Germany. *Ticks and tick-borne diseases* 1 (3), 141–144. 10.1016/j.ttbdis.2010.06.001.

45. Klaus, C., Beer, M., Saier, R., Schubert, H., Bischoff, S., Süß, J., 2011. Evaluation of serological tests for detecting tick-borne encephalitis virus (TBEV) antibodies in animals. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 124 (11-12), 443–449.
46. Klaus, C., Beer, M., Saier, R., Schau, U., Moog, U., Hoffmann, B., Diller, R., Süß, J., 2012. Goats and sheep as sentinels for tick-borne encephalitis (TBE) virus--epidemiological studies in areas endemic and non-endemic for TBE virus in Germany. *Ticks and tick-borne diseases* 3 (1), 27–37. 10.1016/j.ttbdis.2011.09.011.
47. Klaus, C., Ziegler, U., Kalthoff, D., Hoffmann, B., Beer, M., 2014. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) – findings on cross reactivity and longevity of TBEV antibodies in animal sera. *BMC Veterinary Research* 10, 78. 10.1186/1746-6148-10-78.
48. Kríz, B., Benes, C., Daniel, M., 2009. Alimentary transmission of tick-borne encephalitis in the Czech Republic (1997-2008). *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie : casopis Spolecnosti pro epidemiologii a mikrobiologii Ceske lekarske spolecnosti J.E. Purkyne* 58 (2), 98–103.
49. Kríz, B., Daniel, M., Benes, C., Maly, M., 2014. The Role of Game (Wild Boar and Roe Deer) in the Spread of Tick-Borne Encephalitis in the Czech Republic. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 14 (11), 801–807. 10.1089/vbz.2013.1569.
50. Labuda, M., Danielova, V., Jones, L.D., Nutall, P.A., 1993. Amplification of tick-borne encephalitis virus infection during co-feeding of ticks. *Med Vet Entomol* 7, 339-342.
51. Lindgren, E., Gustafson, R., 2001. Tick-borne encephalitis in Sweden. *Lancet* 358, 16-18.
52. Mans, B.J., Louw, A.I., Neitz, A.W., 2003. The major tick salivary gland proteins and toxins from the soft tick, *Ornithodoros savignyi*, are part of the tick lipocalin family: implications for the origins of tick toxicoses. *Mol. Biol. Evol.* 20, 1158–1167.
53. Markovinović, L., Kosanović Ličina, M.L., Tešić, V., Vojvodić, D., Vladušić Lucić, I., Kniewald, T., Vukas, T., Kutleša, M., Krajinović, L.C., 2016. An outbreak of tick-borne encephalitis associated with raw goat milk and cheese consumption, Croatia, 2015. *Infection* 44 (5), 661–665. 10.1007/s15010-016-0917-8.
54. Miller, M.K., 2002. Massive tick (*Ixodes holocyclus*) infestation with delayed facial-nerve palsy. *Med. J. Aust.* 176, 264–265.
55. Mlera, L., Bloom, M.E., 2018. The Role of Mammalian Reservoir Hosts in Tick-Borne Flavivirus Biology. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8. 10.3389/fcimb.2018.00298.
56. Nosek, J., Grulich, I., 1967. The relationship between the tick-borne encephalitis virus and the ticks and mammals of the Tribeč Mountain range. *Bulletin of the World Health Organization* 36 (Suppl 1), 31–47.
57. Pienaar, R., Neitz, A.W.H., Mans, B.J. 2018. Tick Paralysis: Solving an Enigma. *Veterinary Sciences* 5(2), pii: E53. doi: 10.3390/vetsci5020053.
58. Robert Koch Institut. FSME: Zum aktuellen Vorkommen in Deutschland - Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos - Karte der Risikogebiete. *Epidemiologisches Bulletin* 2008;17: 133-140.
59. Robert Koch Institut, 2019. FSME: Risikogebiete in Deutschland (Stand: Januar2019). Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos. *Epid. Bull.* 7, 57–71.
60. Roelandt, S., Suin, V., Riocreux, F., Lamoral, S., van der Heyden, S., van der Stede, Y., Lambrecht, B., Caij, B., Brochier, B., Roels, S., van Gucht, S., 2014. Autochthonous tick-borne encephalitis virus-seropositive cattle in Belgium: a risk-based targeted serological survey. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 14 (9), 640–647. 10.1089/vbz.2014.1576.
61. Rose, I., 1954. A review of tick paralysis. *Can. Med. Assoc. J.* 70, 175–176.

62. Salat, J., Mihalca, A.D., Mihaiu, M., Modrý, D., Ruzek, D., 2017. Tick-Borne Encephalitis in Sheep, Romania. *Emerging Infectious Diseases* 23 (12), 2065–2067. 10.3201/eid2312.170166.
63. Schrader, C., Süß, J. 1999. A nested RT-PCR for the detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in natural foci. *Zentralbl Bakteriologie* 289, 319-328.
64. Skarpaas, T., Ljøstad, U., Sundøy, A., 2004. First Human Cases of Tickborne Encephalitis, Norway. *Emerging Infectious Diseases* 10 (12), 2241–2243. 10.3201/eid1012.040598.
65. Stiasny, K., Holzmann, H., Heinz, F., X., 2009. Characteristics of antibody responses in tick-borne encephalitis vaccination breakthroughs. *Vaccine* 27, 7021-7026.
66. Sumilo, D., Bormane, A., Asokliene, L., et al. 2008. Socio-economic factors in the differential upsurge of tick-borne encephalitis in Central and Eastern Europe. *Rev Med Virol* 18, 81–95.
67. Süß, J., Béziat, R., Rohr, H.P., Treib, J., Haass, A., 1996. Detection of the Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV) in Ticks in Several Federal "Länder" of Germany by Means of the Polymerase Chain Reaction (PCR) - Characterization of the Virus. *Infection* 24, 403-404.
68. Süß, J., Klaus, C., Diller, R., Schrader, C., Wohanka, N., Abel, U., 2006. TBE incidence versus virus prevalence and increased prevalence of the TBE virus in *Ixodes ricinus* removed from humans. *Int J Med Microbiol* 296 (S1), 63-68.
69. Süß, J., Schrader, C., 2004. Durch Zecken übertragene humanpathogene und bisher als apathogen geltende Mikroorganismen in Europa Teil I: Zecken und Viren. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz*. 47, 392-404.
70. Süß, J., Sinnecker, H., Sinnecker, R., et al., 1992. Epidemiology and ecology of tick-borne encephalitis in the eastern part of Germany between 1969 and 1990 and studies on the dynamics of a natural focus of tick-borne encephalitis. *Zentralbl Bakteriologie* 277, 224-235.
71. Süß, J., 2008. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – the epidemiological situation as of 2007. *Eurosurveillance*. 13, 1-8.
72. Süß, J., 2011. Tick-borne encephalitis 2010 epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia—an overview. *Ticks Tick Borne Dis*. 2, 2–15.
73. Süß, J., Kahl, O., Aspöck, H., et al. 2010. Tick-borne encephalitis in the age of general mobility. *Wiener Med. Wschr*. 160, 1-7
74. Tonteri, E., Jokelainen, P., Matala, J., Pusenius, J., Vapalahti, O. Serological evidence of tick-borne encephalitis virus infection in moose and deer in Finland: sentinels for virus circulation. *Parasit Vectors*. 2016 Jan 29;9:54. doi: 10.1186/s13071-016-1335-6.
75. Torres, J.M., Schlossberg, D., 2000. Tick paralysis. In: Cunha, B.A. (Ed.), *Tick-borne Infectious Diseases – Diagnosis and Management*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 103–110.
76. Vedanarayanan, V., Evans, O.B., Subramony, S.H., 2002. Tick paralysis in children: electrophysiology and possibility of misdiagnosis. *Neurology* 59, 1088–1090.
77. Velay, A., Solis, M., Kack-Kack, W., Gantner, P., et al., 2018. A new hot spot for tick-borne encephalitis (TBE): A marked increase of TBE cases in France in 2016. *Ticks and tick-borne diseases*. 9 (1), 120–125. 10.1016/j.ttbdis.2017.09.015.
78. Zeman, P., Bene, C., 2004. A tick-borne encephalitis ceiling in Central Europe has moved upwards during the last 30 years: possible impact of global warming? *Int J Med Microbiol*. 293 (S37), 48-54.

ORIGINALARBEITEN

Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus bei Menschen und Zecken in Mecklenburg-Vorpommern.

Tick-borne encephalitis virus in humans and ticks in Northeastern Germany.

Frimmel S, Krienke A, Riebold D, Löbermann M, Littmann M, Fiedler K, Klaus C, Süss J, Reisinger EC.

Dtsch Med Wochenschr. 2010; 135: 1393-1396.

Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus bei Menschen und Zecken in Mecklenburg-Vorpommern

Tick-borne encephalitis virus in humans and ticks in Northeastern Germany

Autoren

S. Frimmel¹ A. Krienke¹ D. Riebold¹ M. Löbermann¹ M. Littmann² K. Fiedler² C. Klaus³ J. Süß³ E. C. Reisinger¹

Institut

¹ Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II, Universität Rostock

² Landesamt für Gesundheit und Soziales Mecklenburg Vorpommern, Rostock

³ Friedrich-Loeffler-Institut Jena, Nationales Referenzlabor für durch Zecken übertragene Erkrankungen, Jena

Einleitung

In Deutschland werden vor allem die Erreger der Lyme-Borreliose und das Virus der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) durch Zecken übertragen. Durch Zecken übertragene Ehrlichien, Babesien oder Rickettsien, die zu klinischen Erkrankungen führen, wurden in Deutschland nur in Einzelfällen beobachtet [7, 15, 23, 24].

Das FSME-Virus ist das bedeutendste humanpathogene Arbovirus („arthropode borne virus“) Zentraleuropas. Außer auf der Iberischen Halbinsel, in den Beneluxstaaten und im Vereinten Königreich kommt die FSME überall in Europa und in einigen Ländern Asiens vor [24, 27].

Das FSME-Virus ist ein RNA-Virus aus der Familie der Flavi-Viren, wie auch das Dengue-, Gelbfieber- oder West-Nil-Virus. Der in Deutschland vorkommende zentraleuropäische Subtyp wird meist durch *Ixodes ricinus* (Holzbock), der fernöstliche und der sibirische Subtyp am häufigsten von *Ixodes persulcatus* (Taigazecke) übertragen (Tab. 1). Nach der FSME-Impfung oder nach durchgemachter Infektion besteht eine Kreuzimmunität gegen alle drei Subtypen [24].

Die FSME-Erkrankung beginnt nach einer Inkubationszeit von wenigen Tagen bis maximal 4 Wochen (in der Regel 7–14 Tage). Bei etwa 70 % der Fälle kommt es zu grippeartigen Symptomen, wie Fieber, Kopf-, Hals- und Bauchschmerzen, sowie gelegentlichem Durchfall. Nach einem beschwerdefreien Intervall von wenigen Tagen treten in der zweiten Krankheitsphase eine Meningitis, Meningoenzephalitis oder Meningoenzephalomyelitis mit plötzlich einsetzenden heftigen Kopfschmerzen und Müdigkeit auf. Lähmungen bis hin zu Para- oder Tetraplegien und Hirnnervenparesen können folgen. Typisch für die FSME sind neben Be-

Tab. 1 FSME-Virus-Subtypen (Auswahl).

FSME-VIRUS		
Europäischer Subtyp	Fernöstlicher Subtyp	Sibirischer Subtyp
Hanzalova Stamm	Absettarov Stamm	Aina Stamm
Hypr Stamm	Sofjin Stamm	Vasilchenko Stamm
Kumlinge Stamm		Latvi-1–96 Stamm
Neudörfel Stamm		

wusstseinsstörungen eine Stand- und Gangataxie, fokale und generalisierte Anfälle, ein Intentionstremor sowie seltener extrapyramidale Symptome wie Rigor, Hypokinese und Bradydadochokinese. Nach 1–3 Wochen kommt es bei etwa 35 % der Patienten zur Ausheilung. Bleibende Residualschäden wie Paresen oder Ataxie werden bei bis zu 30 % der schweren Verläufe beschrieben. Die Tendenz zu schweren Verläufen steigt mit zunehmendem Lebensalter insbesondere bei Meningoenzephalitis und Myelitis [4, 10, 11].

Die Zahl der humanen FSME-Infektionen hat sich in Europa seit 1983 mehr als verdreifacht [25, 26]. Auch in Höhenlagen wird die FSME vermehrt beobachtet. Im Juli 2008 wurde in den österreichischen Alpen, in einer Höhe von 1500 m über dem Meeresspiegel, die FSME durch nicht pasteurisierte Ziegenmilch auf sechs Menschen übertragen [1, 8, 29].

In Deutschland stieg die Zahl der FSME-Risikogebiete (Definition **Kasten 1**) in den letzten drei Jahren von 96 auf 136 [16, 17]. Es wird vermutet, dass neben milden Wintertemperaturen und Veränderungen des Wildbestandes auch das Freizeitverhalten und die Durchimpfungsrate der Bevölkerung Einfluss auf die Verbreitung von

Virologie, Parasitologie

Schlüsselwörter

- ▶ FSME-Virus
- ▶ Zecken
- ▶ *Ixodes ricinus*
- ▶ globale Erwärmung
- ▶ Mecklenburg-Vorpommern
- ▶ klinische Erkrankungen

Keywords

- ▶ tick-borne encephalitis
- ▶ ticks
- ▶ *Ixodes ricinus*
- ▶ global warming
- ▶ Mecklenburg-Western-Pomerania
- ▶ clinical cases

eingereicht 28.2.2010
akzeptiert 9.5.2010

Bibliografie

DOI 10.1055/s-0030-1262424
Dtsch Med Wochenschr 2010;
135: 1393–1396 · © Georg
Thieme Verlag KG Stuttgart ·
New York · ISSN 0012-0472

Korrespondenz

Prof. Dr. Emil C. Reisinger
Abteilung für Tropenmedizin
und Infektionskrankheiten
Klinik für Innere Medizin II
Universitätsklinik Rostock
Ernst-Heydemann-Str. 6
18057 Rostock
Tel. 0381/494-7510
Fax 0381/494-7509
eMail emil.reisinger@
uni-rostock.de

Ixodes ricinus und auf das vermehrte Auftreten von FSME haben [1, 2, 14, 19].

Kasten 1

Definition eines FSME-Risikogebietes (Robert-Koch-Institut):
Ein Kreis wird als FSME-Risikogebiet definiert, wenn die Anzahl der übermittelten FSME-Erkrankungen in den Zeiträumen 2002 bis 2006, 2003 bis 2007 oder 2004 bis 2008 im Kreis oder in der Kreisregion (bestehend aus dem betreffenden Kreis plus allen angrenzenden Kreisen) signifikant ($p < 0,05$) höher liegt als die bei einer Inzidenz von 1 Erkrankung/100000 Einwohner erwartete Fallzahl.

Das FSME-Virus wurde bei 0,5–2% der nüchternen Zecken und bei 7–20% der vollgesaugten Zecken in den gleichen Gebieten nachgewiesen. Das lässt darauf schließen, dass die Blutmahlzeit zu einer Virusvermehrung in der Zecke führt [26].

Zwischen 1960 und 1985 wurden in Mecklenburg-Vorpommern (MV) bei Neustrelitz vier humane FSME-Fälle beobachtet [5, 20, 21]. 1992 wurden zuletzt natürliche FSME-Herde in Zecken beschrieben [20, 22]. Zwischen 1993 – 2004 wurden insgesamt 16089 Zecken in MV negativ auf FSME getestet (unveröffentlichte Daten des Landesamtes für Gesundheit und Soziales, MV), daher galt MV als FSME frei.

Wir fassen drei autochthone, humane FSME-Fälle zusammen, die von 2004 bis 2006, also erstmals nach 19 Jahren in MV wieder aufgetreten sind [3, 5] (Abb. 1) und beschreiben die gezielte Suche nach natürlichen FSME-Herden durch den FSME-Virusnachweis in nüchternen und gesogenen Zecken.

kurzgefasst

Die Zahl der FSME-Infektionen in Europa hat zugenommen, FSME-Viren wurden in nördlicheren Gebieten sowie in größeren Höhenlagen nachgewiesen. Der letzte FSME-Nachweis in Zecken in Mecklenburg-Vorpommern war 1992. Zwischen 2004 und 2006 traten in Mecklenburg-Vorpommern drei autochthone FSME-Fälle bei Menschen auf.

Fallbeispiele



Fall 1

Ein ungeimpfter 61-jähriger Patient wurde am Woblitzsee, nahe Neustrelitz (Abb. 1), Ende Mai 2004 von einer Zecke in die linke Leiste gestochen. Noch am selben Nachmittag entfernte er die Zecke. Neun Tage später hatte er Fieber und Kopfschmerzen für drei Tage. Nach einem symptomfreien Intervall wurde er drei Wochen nach dem Stich mit Fieber, Somnolenz, verwaschener Sprache, verlangsamter Feinmotorik und einer ungerichteten Fallneigung stationär aufgenommen. Die Liquordiagnostik ergab eine diskrete Pleozytose, eine Eiweißerhöhung und liquorständige IgM-Produktion. FSME-IgG- und IgM-Antikörper waren im Serum und im Liquor positiv (ELISA). Nach langsamem Rückgang der Symptomatik war der Patient 44 Tage nach dem Zeckenstich wieder vollständig genesen [5].

Fall 2

Eine ungeimpfte 69-jährige Frau aus Stralsund wurde im November 2005 aufgrund einer zeitweiligen Desorientiertheit mit diffuser Schwindelsymptomatik und Bewusstseinstörungen in

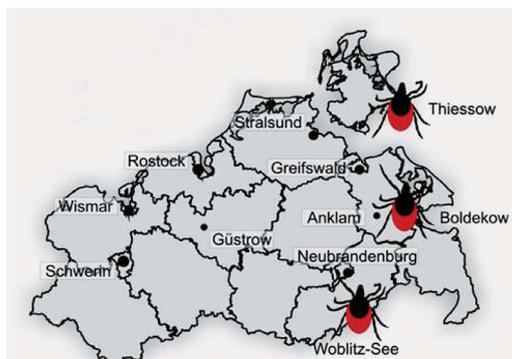


Abb. 1 Gebiete mit autochthonen FSME-Fällen in Mecklenburg-Vorpommern 2004–2006 und Zecken-Fanggebiete 2007.

das Krankenhaus eingewiesen. Die Patientin berichtete von regelmäßigen Zeckenstichen auf einem Zeltplatz in Thiessow auf Rügen (Abb. 1), wo die Patientin Dauercamperin ist. In der Woche vor der stationären Aufnahme klagte die Patientin über diffuse, dumpf-drückende Kopfschmerzen, Husten und ein allgemeines Krankheitsgefühl. Bei Aufnahme zeigte sich eine Leukozytose im peripheren Blut und eine geringfügige Eiweißerhöhung des Liquors mit einer leichten Schrankenstörung. Anfang Dezember erfolgte der positive FSME-IgM und -IgG-Antikörper-Nachweis im Serum. Im weiteren Verlauf normalisierte sich der psychische Zustand der Patientin und sie konnte nach neun Tagen ohne neurologische Defizite nach Hause entlassen werden.

Fall 3

Ein ungeimpfter 76-jähriger Patient wurde Ende Juni 2006 wegen rezidivierendem Fieber bis 40°C, Kopfschmerzen, Somnolenz, Kreislaufdysregulation und Tetraparese stationär aufgenommen. Er war Anfang Juni in der Nähe von Boldekow im Landkreis Ostvorpommern von einer Zecke gestochen worden. Der Liquor zeigte eine geringgradige Eiweißerhöhung, FSME-IgM und -IgG-Antikörper wurden im Serum nachgewiesen. Nach 17 Tagen im Akutkrankenhaus erfolgte die Verlegung in ein neurologisches Rehabilitationszentrum, von wo der Patient nach zwei Monaten bei voller Mobilität und Selbständigkeit, mit lediglich diskretem feinmotorischen Defizit, entlassen wurde.

FSME-Nachweis in Zecken



In jeder Region in der ein Fall von FSME beschrieben wurde, wurden nüchterne Nymphen gesammelt. Je 50 Nymphen pro Region wurden einzeln bei minus 80°C eingefroren und danach wie unten beschrieben, aufgearbeitet.

Weitere 50 Nymphen aus jeder Region wurden zur Blutmahlzeit an Mäuse angesetzt. Je zehn Nymphen wurden in einer Kammer (ein abgeschnittener 10 ml-Spritzenkolben mit Deckel) auf dem proximalen Rücken einer 12 Wochen alten immun-kompetenten NMRI-Maus (Naval Medical Research Institute) mit Latex-Klebstoff befestigt und mit Gaze an der Maus fixiert.

Nach fünf Tagen wurden die lebenden und vollgesogenen Zecken mit Pinzetten entfernt, einzeln bei minus 80°C eingefroren und danach wie unten beschrieben aufgearbeitet.

Jede Zecke wurde mit Micropipistills in 200 µl steriler 0,9%-iger Kochsalz-Lösung in einem 1,5 ml-Tube homogenisiert. Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem „DNeasy® blood and tissue kit“ von Qiagen. Nach der Isolation wurde eine nested Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (nRT-PCR) mit drei Primern durchgeführt [19]. 5 µl jedes positiven PCR-Ergebnisses wurden auf ein 1%-iges Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Gel aufgetragen und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die Konzentration des DNA-Amplifikates wurde mit GeneQuant II gemessen und die amplifizierte DNA wurde sequenziert. Die DNA-Sequenzanalyse wurde mittels BLAST®-Version 2.2.18 (National Center of Biotechnology and Information, Bethesda, MD, USA) und MEGA 4.0 (Center for Evolutionary and Functional Genomics, Tempe, AZ, USA) durchgeführt.

Die Statistik wurde mit SPSS 11.0 berechnet (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Die FSME-Virus Prävalenz in gesogenen und nüchternen Nymphen jeder Region wurde mittels Fishers-Exact-Test verglichen.

kurzgefasst

Aus den Gebieten in denen humane FSME-Fälle aufgetreten waren, wurden Zecken gesammelt und zum Teil nach einer Blutmahlzeit auf Labormäusen (NMRI) mittels PCR auf das Vorliegen von FSME-RNA untersucht.

Ergebnisse

Alle drei Patienten waren mindestens vier Monate vor Beginn der Erkrankung nicht verreist, bei einer Inkubationszeit von maximal vier Wochen konnte eine importierte FSME ausgeschlossen werden.

Zwischen Februar und Mai 2007 wurden Ixodes-ricinus-Nymphen durch „flagging“ in den drei Regionen gesammelt, in denen die Fälle von FSME beschrieben wurden: am Woblitsee bei Neustrelitz, bei Boldekow nahe Anklam und in Thiessow auf Rügen. Beim „flagging“ wird ein großes weißes Tuch an einem Stock befestigt und über Gräser und Büsche gezogen. Die Zecken werden dann mit einer Pinzette vom Tuch abgesammelt. Insgesamt wurden 250 Ixodes-ricinus-Nymphen einzeln aufgearbeitet. RNA wurde aus je 50 ungesogenen Zecken pro Region und aus den an Mäusen gesogenen Zecken vom Woblitsee (27 Zecken), aus Thiessow (39 Zecken) und aus Boldekow (34 Zecken) isoliert.

Sechs von 250 (2,4%) Nymphen waren in der FSME-PCR positiv. Vom Woblitsee waren drei von 50 (6%) der nüchternen und eine von 27 (3,7%) der gesogenen Nymphen positiv. Aus Thiessow war eine von 50 (2%) der nüchternen und eine von 39 (2,6%) der gesogenen Nymphen positiv. Aus Boldekow war keine der Zecken positiv. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Infektionsraten von gesogenen und nüchternen Zecken ($p > 0,05$). Die Sequenzen wiesen eine Homologie von 91–98% für den Neudoerfl-Stamm des europäischen FSME-Subtyps auf. Alle Proben hatten eine Punktmutation von T zu A an Position 98, die zwei Sequenzen aus Thiessow auch an den Positionen 140 und 143 (Abb. 2).

```

Re1      TTCGGACAGC ATTAGCAGCG GTTGGTTGA AAGAGATATT CTTTGTTC TACCAGTGT A02210
Wu01     .....
Wu09     .....
Wu10     .....A
Wf5.5    .....T
Tu30     .....T
Tf16.2   .....

61      GAACGTGTTG AGAAAAGAC AGCTTAGGAG AACAGAGCT GGGGATGTC AAGAAGCCA A02210
Wu01     .T...CTG...C...G...C...A...
Wu09     .....C...C...C...A...
Wf5.5    .....C...C...C...C...
Tu30     ..C...G...G...C...C...C...
Tf16.2   ..G...C...G...C...C...G...

121     TCCTGAAGG TAAGGGGGC GGTCCCOCTC GACGAGTCT GAAGAGACC GCAA A02210
Wu01     .....A...A...A...A...
Wu09     .....T...T...T...T...
Wu10     .....C...C...C...C...
Wf5.5    .....C...C...C...C...
Tu30     ..A...C...G..C...A..A...
Tf16.2   ..A...C...G..C...A..A...

```

Abb. 2 RNA-Sequenzen verglichen mit dem FSME-Stamm A02210 (Neudoerfl). Re = Referenzstamm A02210 Neudoerfl, Wu = Woblitsee, nüchterne Zecke, Wf = Woblitsee, gesogene Zecke, Tu = Thiessow/Rügen nüchterne Zecke, Tf = Thiessow/Rügen gesogene Zecke, „...“ bedeutet Homologie zum Referenzstamm, unterstrichen sind die Primer-Bindestellen.

kurzgefasst

Bei insgesamt 2,4% der Zecken aus zwei von drei Fanggebieten gelang der FSME-Nachweis.

Diskussion

Nachdem in MV seit 1985 keine FSME-Infektionen beim Menschen aufgetreten waren und von 1992 bis 2004 keine FSME-Viren in Zecken gefunden wurden, galt MV als FSME-frei. Das erneute Auftreten von FSME-Erkrankungen nach 19 Jahren zeigt, dass FSME-Herde auch nach vielen Jahren nicht erlöschen oder erneut von infizierten Zecken besiedelt werden. Möglicherweise ist in den letzten Jahren bei Meningoenzephalitiden die FSME differentialdiagnostisch nicht berücksichtigt und so übersehen worden. Der Nachweis des FSME-Virus in Zecken in zwei der drei Waldgebieten, in denen 2004 und 2005 auch humane Fälle von FSME aufgetreten waren, lässt ein ähnlich fokales Vorkommen von FSME in Naturherden vermuten, wie es aus Endemiegebieten beschrieben wird.

Der erste Nachweis des FSME-Virus in Zecken in MV seit 15 Jahren könnte durch die wärmeren Wintertemperaturen erklärt werden, die eine höhere Aktivität der Zecken und so eine höhere Anzahl von Zeckenstich-Expositionen bedingen [2,6,9,14]. Der Winter 2006/2007 war der wärmste Winter in Deutschland seit Einführung der jährlichen Temperaturstatistik 1901. In MV wurde eine durchschnittliche Temperatur von 4,6°C und damit 4,4°C über dem langjährigen Durchschnitt gemessen [12]. Der fehlende Nachweis von FSME in mehr als 16000 Zecken von 1992–2004 kann auch dadurch erklärt werden, dass das Virus fokal auftritt und die Sammelgebiete diese streng umschriebenen, z.T. sehr kleinen Herdgebiete nicht umfassten. Auch durch die weit verbreitete Praxis der Untersuchung von Pools von 3–10 adulten Zecken oder von bis zu 200 Nymphen kann sich die RNA-Konzentration unter die Nachweisgrenze verdünnen. Besonders in Regionen mit niedriger FSME-Virus-Prävalenz können so negative Ergebnisse vorgetäuscht werden. Daher wurden alle Nymphen in unserer Studie einzeln aufgearbeitet. Dabei waren insgesamt sechs von 250 Zecken in der nRT-PCR FSME-Virus-positiv. Nahe dem Woblitsee, wo 2004 ein autochthoner klinischer Fall von FSME gemeldet worden war, waren vier von 77 Zecken FSME-Virus-positiv. In Thiessow, am südöstlichen Teil von Rügen waren zwei von 89 Zecken FSME-Virus-positiv.

Der FSME-Virus-Nachweis war in Zecken, die auf Menschen gesogen hatten, bis zu 21,5-fach häufiger positiv als in nüchternen Zecken [26]. Daher ließen wir einen Teil der in unserer Studie gesammelten Zecken auf Mäusen saugen, um durch die postulierte Virusvermehrung während der Blutmahlzeit eine höhere Ausbeute von FSME-Viren in gesogenen Zecken zu finden. Wir fanden überraschenderweise auch in nicht gesogenen Zecken FSME-Virus, konnten allerdings zwischen gesogenen und nüchternen Nymphen keinen signifikanten Unterschied feststellen. „Co-feeding“, das gleichzeitige Saugen mehrerer Zecken an gleicher Stelle eines Wirtes, kann die Virusübertragung von infizierten adulten Zecken auf nicht-infizierte Nymphen begünstigen [13], dies war in unserer Studie jedoch nicht der Fall.

Wir konnten zeigen, dass in „Nicht-Risikogebieten“ natürliche FSME-Virus-Herde entweder unerkannt über lange Zeit persistieren oder auch nach Jahren wieder aktiv werden können. Weitere Untersuchungen in MV erscheinen notwendig, um weitere natürliche FSME-Virus-Herde zu erkennen, und um mögliche Risikogebiete frühzeitig zu identifizieren. Untersuchungen von FSME-Virus-Reservoirs, wie z.B. Mäusen, könnten die bisherigen Daten sinnvoll ergänzen. Es wird hier erneut deutlich, dass Endemiegebiete einer viralen Zoonose wie der FSME nur durch Untersuchung aller Teilnehmer an diesem komplexen Geschehen (Erreger, Wirte, Vektoren) hinreichend beschrieben werden können, um dann auf wissenschaftlicher Grundlage Abwehrstrategien zu entwickeln [28].

kurzgefasst

Es konnte gezeigt werden, dass FSME-Naturherde über Jahrzehnte nicht erlöschen. Auch in Nicht-Risikogebieten ist die FSME als Differenzialdiagnose von Enzephalitiden zu berücksichtigen.

Konsequenz für Klinik und Praxis

- ▶ Keine generelle FSME-Impfempfehlung für Mecklenburg-Vorpommern bzw. die genannten Gebiete.
- ▶ Vermehrte differentialdiagnostische Berücksichtigung der FSME bei der Abklärung von Meningoenzephalitiden nach Zeckenstich auch in Nicht-Risikogebieten.
- ▶ Zecken sollen gezielt an Orten gesammelt werden, an denen klinische FSME-Fälle oder andere Hinweise auf ein Virusvorkommen (Antikörper- oder Virusnachweis bei Tieren) vorliegen.
- ▶ Untersuchung von Zecken auf das Vorhandensein von FSME-Viren möglichst nicht in Pools.

Autorenerklärung: Die Autoren erklären, dass sie keine finanziellen Verbindungen mit einer Firma haben, deren Produkt in dem Artikel eine wichtige Rolle spielt (oder mit einer Firma, die ein Konkurrenzprodukt vertreibt).

Literatur

- 1 Danielová V, Rudenko N, Daniel M et al. Extension of Ixodes ricinus ticks and agents of tick-borne diseases in mountain areas in the Czech Republic. *Int J Med Microbiol* 2006; 296 S1: 48–53
- 2 Dautel H, Dippel C, Kämmer D, Werkhausen A, Kahl O. Winter activity of Ixodes ricinus in a Berlin forest. *Int J Med Microbiol* 2008; 298 S1: 50–54
- 3 Demikhovska E, Sinha S, Littmann M. Jahresbericht 2006 über die erfassten meldepflichtigen Infektionskrankheiten in Mecklenburg-Vorpommern. 24–26
- 4 Dumpis U, Crook D, Oksi J. Tick-borne encephalitis. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 882–890

- 5 Hemmer CJ, Littmann M, Löbermann M et al. Ein Fall einer autochthonen Frühsommermeningoenzephalitis (FSME) in Mecklenburg-Vorpommern. *Dtsch Med Wochenschr* 2005; 130: 2507–2510
- 6 Hemmer CJ, Frimmel S, Kinzelbach R, Gürtler L, Reisinger EC. Globale Erwärmung: Wegbereiter für tropische Infektionskrankheiten in Deutschland? *Dtsch Med Wochenschr* 2007; 132: 2583–2589
- 7 Hildebrandt A, Hunfeld KP, Baier M et al. First confirmed autochthonous case of human Babesia microti infection in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 595–601
- 8 Holzmann H, Aberle SW, Stiasny K et al. Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1671–1673
- 9 Kahl O. Fatal attraction or how do we get tick bites? *Infection* 1996; 24: 394–395
- 10 Kaiser R. Epidemiologie und Verlauf der Frühsommer-Meningoenzephalitis in Baden-Württemberg zwischen 1994 und 1999. *Dtsch Med Wochenschr* 2000; 125: 1147–1153
- 11 Kaiser R. Neuroborreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis – Gemeinsamkeiten und Unterschiede. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2005; 73: 750–764
- 12 Kirsche U, Lux G. Deutschlandwetter im Winter 2006/07-wärmster Winter aller Zeiten. DWD. Pressemitteilung 27.02.2007 <http://www.dwd.de>
- 13 Labuda M, Danielova V, Jones LD, Nutall PA. Amplification of tick-borne encephalitis virus infection during co-feeding of ticks. *Med Vet Entomol* 1993; 7: 339–342
- 14 Lindgren E, Gustafson R. Tick-borne encephalitis in Sweden. *Lancet* 2001; 358: 16–18
- 15 Löbermann M, Fingerle V, Lademann M, Fritzsche C, Reisinger EC. Borrelia burgdorferi and Anaplasma phagocytophilum coinfection. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 353–355
- 16 RKI. FSME: Zum aktuellen Vorkommen in Deutschland – Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos – Karte der Risikogebiete. *Epidemiologisches Bulletin* 2008; 17: 133–140
- 17 RKI. FSME: Risikogebiete in Deutschland – Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos – Karte der Risikogebiete. *Epidemiologisches Bulletin* 2009; 18: 165–172
- 18 Schrader C, Süß J. A nested RT-PCR for the detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in natural foci. *Zentralbl Bakteriol* 1999; 289: 319–328
- 19 Sumilo D, Bormane A, Asokliene L et al. Socio-economic factors in the differential upsurge of tick-borne encephalitis in Central and Eastern Europe. *Rev Med Virol* 2008; 18: 81–95
- 20 Süß J, Sinnecker H, Sinnecker R et al. Epidemiology and ecology of tick-borne encephalitis in the eastern part of Germany between 1969 and 1990 and studies on the dynamics of a natural focus of tick-borne encephalitis. *Zentralbl Bakteriol* 1992; 277: 224–235
- 21 Süß J, Béziat R, Rohr HP, Treib J, Haass A. Detection of the Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV) in Ticks in Several Federal „Länder“ of Germany by Means of the Polymerase Chain Reaction (PCR) – Characterization of the Virus. *Infection* 1996; 24: 403–404
- 22 Süß J, Béziat P, Schrader C. Viral zoonosis from the viewpoint of their epidemiological surveillance: tick-borne encephalitis as a model. In: Kaaden OR, Czerny CP. (Hrsg). *Viral zoonosis and food of animal origin – a re-evaluation of possible hazards for human health*. Wien, New York: Eichhorn W. Springer Verlag, 1997: 229–243
- 23 Süß J, Fingerle V, Hunfeld KP, Schrader C, Wilske B. Durch Zecken übertragene humanpathogene und bisher als apathogen geltende Mikroorganismen in Europa Teil II: Bakterien, Parasiten und Viren. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 2004; 47: 470–486
- 24 Süß J, Schrader C. Durch Zecken übertragene humanpathogene und bisher als apathogen geltende Mikroorganismen in Europa Teil I: Zecken und Viren. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 2004; 47: 392–404
- 25 Süß J. Zunehmende Verbreitung der Frühsommer-Meningoenzephalitis in Europa. *Dtsch Med Wochenschr* 2005; 130: 1397–1400
- 26 Süß J, Klaus C, Diller R, Schrader C, Wohanka N, Abel U. TBE incidence versus virus prevalence and increased prevalence of the TBE virus in Ixodes ricinus removed from humans. *Int J Med Microbiol* 2006; 296, S1: 63–68
- 27 Süß J. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – the epidemiological situation as of 2007. *Eurosurveillance* 2008; 13: 1–8
- 28 Süß J, Kahl O, Aspöck H et al. Tick-borne encephalitis in the age of general mobility. *Wiener Med Wschr* 2010; 160: 94–100
- 29 Zeman P, Bene C. A tick-borne encephalitis ceiling in Central Europe has moved upwards during the last 30 years: possible impact of global warming? *Int J Med Microbiol* 2004; 293 Suppl 37: 48–54

Dtsch Med Wochenschr 2010; 135: 1393–1396 · S. Frimmel et al., Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus bei Menschen ...

Tick-borne encephalitis virus habitats in North East Germany: reemergence of TBEV in ticks after 15 years of inactivity.

Frimmel S, Krienke A, Riebold D, Löbermann M, Littmann M, Fiedler K, Klaus C, Süss J, Reisinger EC.

Biomed Res Int. 2014; 2014:3 08371

Research Article

Tick-Borne Encephalitis Virus Habitats in North East Germany: Reemergence of TBEV in Ticks after 15 Years of Inactivity

Silvius Frimmel,¹ Anja Krienke,¹ Diana Riebold,¹ Micha Loebermann,¹ Martina Littmann,² Karin Fiedler,² Christine Klaus,³ Jochen Süß,⁴ and Emil Christian Reisinger¹

¹ Department of Tropical Medicine, Infectious Diseases and Nephrology, University of Rostock Medical School, Ernst-Heydemann-Straße 6, 18057 Rostock, Germany

² Health Department of the State of Mecklenburg-West Pomerania, 18055 Rostock, Germany

³ Friedrich-Loeffler-Institute Jena, National Reference Laboratory for Tick-Borne Diseases, 07743 Jena, Germany

⁴ Tick Information Center, 07646 Lippersdorf, Germany

Correspondence should be addressed to Silvius Frimmel; frimmels@med.uni-rostock.de

Received 5 February 2014; Accepted 6 June 2014; Published 8 July 2014

Academic Editor: Peirong Jiao

Copyright © 2014 Silvius Frimmel et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The incidence of tick-borne encephalitis has risen in Europe since 1990 and the tick-borne encephalitis virus (TBEV) has been documented to be spreading into regions where it was not previously endemic. In Mecklenburg-West Pomerania, a federal state in Northern Germany, TBEV was not detectable in over 16,000 collected ticks between 1992 and 2004. Until 2004, the last human case of TBE in the region was reported in 1985. Following the occurrence of three autochthonous human cases of TBE after 2004, however, we collected ticks from the areas in which the infections were contracted. To increase the chance of detecting TBEV-RNA, some of the ticks were fed on mice. Using nested RT-PCR, we were able to confirm the presence of TBEV in ticks for the first time after 15 years. A phylogenetic analysis revealed a close relationship between the sequences we obtained and a TBEV sequence from Mecklenburg-East Pomerania published in 1992 and pointed to the reemergence of a natural focus of TBEV after years of low activity. Our results imply that natural foci of TBEV may either persist at low levels of activity for years or reemerge through the agency of migrating birds.

1. Introduction

Tick-borne encephalitis (TBE) is the most widespread arthropod-borne viral disease in central Europe. The TBE virus belongs to the genus *Flavivirus* (Fam. *Flaviviridae*), which has three different subtypes: the European subtype, transmitted by *Ixodes ricinus*, and the Siberian subtype and the Far Eastern subtype, both transmitted by *Ixodes persulcatus*. The European subtype is found in all European countries except the Benelux and Great Britain [1, 2].

The incidence of TBE in Europe has risen dramatically since 1990 [3–5]. Comparing the periods from 1974 to 1983 and 1994 to 2003, the average increase in TBE infections in humans in ten European countries was 311% [5]. In Germany, the number of reported TBE cases increased from 254 in 2001 to a maximum of 546 in 2006 and the number of areas at risk for TBE transmission increased from 96 in 2005 to 137

in 2012 [6]. Epidemiological analyses of the two decades from 1991 to 2000 and 2001 to 2010 in Germany show a significant ($P < 0.001$) increase in morbidity to 199.4% [2]. 410 TBE infections were reported in 2013 [7]. In Bavaria and Baden-Württemberg, 0.5 to 2% of unfed ticks have been shown to be TBEV-infected. However, in fed ticks removed from humans, TBEV RNA was detected in 7 to 20% in endemic areas of high risk, indicating that the infection rate in fed ticks can be up to 21.5 times higher than in unfed ticks. On this basis it has been hypothesized that a blood meal leads to an increase in virus replication [5].

Over the last few years, the TBE virus has been documented to be spreading into regions where it was not previously endemic. Not only has it been detected in more northern areas such as Denmark and Norway, it has also been found at higher altitudes, including the Krkonose Mountains in the Czech Republic and the Austrian Alps [2, 4, 8–11].

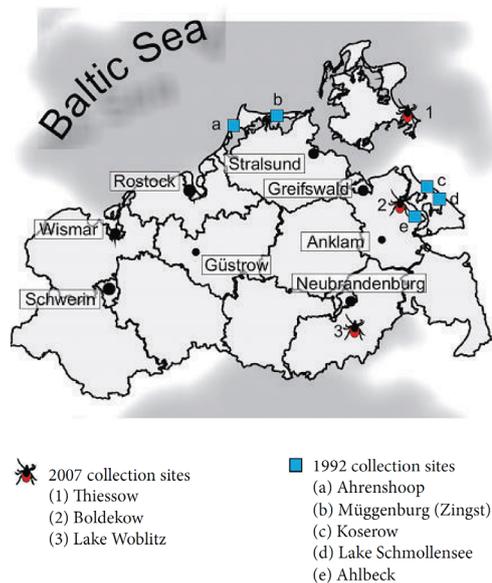


FIGURE 1: Tick-collection sites from 2007, where autochthonous cases of TBE have appeared in Mecklenburg-West Pomerania since 2004 and natural TBEV foci of 1992.

In July 2008, six human TBE virus infections occurred after consumption of unpasteurized goat's milk at an altitude of 1,500 meters a.s.l. [8]. The incidence of TBE depends on the density of infected host-seeking ticks, the level of exposure, and the vaccination rate of the population [5, 12, 13].

Mecklenburg-West Pomerania had never been declared as an area of risk according to the definition of the public health authority, but few autochthonous cases and TBEV-RNA detection in ticks showed a low activity of the virus in the past: from 1960 to 1985, four human cases of TBE were reported east of the town Neustrelitz in Mecklenburg-West Pomerania [6, 14, 15], and natural foci of TBEV were detected in tick pools in North East Germany using RT-PCR in 1992 [14, 16] (Figure 1). Between 1992 and 2003, a total of 16,089 ticks tested negative for TBEV in Mecklenburg-West Pomerania and it was thought that TBEV had disappeared from this area (Health Department of the State of Mecklenburg-West Pomerania, unpublished data) [17].

Then, in 2004, the first autochthonous case of TBE in Mecklenburg-West Pomerania for 19 years was reported from Lake Woblitz (near Neustrelitz), to be followed by one case in the village of Boldekow near Anklam and one in Thiessow on the island of Ruegen [18, 19] (Figure 1). This led us to search for natural foci of TBEV in the regions where these cases appeared.

The aim of this study was to evaluate the prevalence of TBE virus in fed and unfed nymphs of *Ixodes ricinus* in Mecklenburg-West Pomerania.

2. Animals, Material, and Methods

Between February and May 2007, 300 *Ixodes ricinus* ticks were collected by flagging in the regions of Lake Woblitz (Neustrelitz), Boldekow near Anklam, and Thiessow on the island of Ruegen (Figure 1). 50 unfed nymphs from each region were processed immediately as described below or frozen separately at -80°C . Another 50 nymphs from each region were put to feed on mice.

Tick-feeding chambers were prepared as follows: 10 ml syringes (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) were cut to a length of 10 mm and fixed with gauze to the proximal back of a 12-week-old immunocompetent NMRI (Naval Medical Research Institute) mouse from conventional (open-caged) housing, with health status control. Supplier of the mice: Harlan Laboratories, Inc. (Rossdorf, Germany). Ten *Ixodes ricinus* nymphs were placed together in one feeding chamber for five days. The engorged ticks were then removed with pointed tweezers and used for RNA isolation as described below or frozen separately at -80°C . Only 100 of 150 fed ticks were engorged and alive when we removed the feeding chambers and were processed as described below.

Each tick (fed and unfed) was processed separately to avoid possible RNA dilution by pooling. Each tick was homogenized using a sterile micropipette (Eppendorf, Hamburg, Germany) and then mixed in 200 μl sterile 0.9% NaCl solution in a 1.5 ml tube. RNA and DNA isolation was performed using the DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions without adding RNase to the procedure. This method was chosen in order to copurify DNA from ticks for further studies. After isolation, a nested RT-PCR was performed as described [20], using the primers Pp1 (5'-GCG TTT GCT TCG GAC AGC ATT AGC-3') and Pm1 (5'-GCG TCT TCG TTG CGG TCT CTT TCG-3') for the first PCR step and Pp2 (5'-TCG GAC AGC ATT AGC AGC GGT TGG-3') and Pm2 (5'-TGC GGT CTC TTT CGA CAC TCG TCG-3') for the second PCR step. 5 μl of each PCR product was analyzed by electrophoresis on 1% tris acetate EDTA (TAE) gel. The positive PCR products were then excised from the gel and transferred separately to 1.5 ml tubes, where they were purified using the gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany). The DNA concentration was measured using GeneQuant II (Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) and the PCR products were sequenced (MWG Biotech, Ebersberg, Germany).

A DNA sequence analysis was performed using BLAST version 2.2.18 (National Center of Biotechnology and Information; Bethesda, MD, USA) and MEGA 4.0 (Center for Evolutionary and Functional Genomics, NCBI, Tempe, AZ, USA) to confirm TBEV subtypes and detect point mutations. As reference strains, the TBEV sequences Neudoerfl (U27495.1), Salem (FJ572210.1), Hypr (U39292.1), and Toro-2003 (DQ401140.2) were used.

A phylogenetic analysis was carried out using the program CLC main workbench version 5.0 (CLC bio, Aarhus, Denmark). A phylogenetic tree was created using the neighbour joining method (1000 replicates).

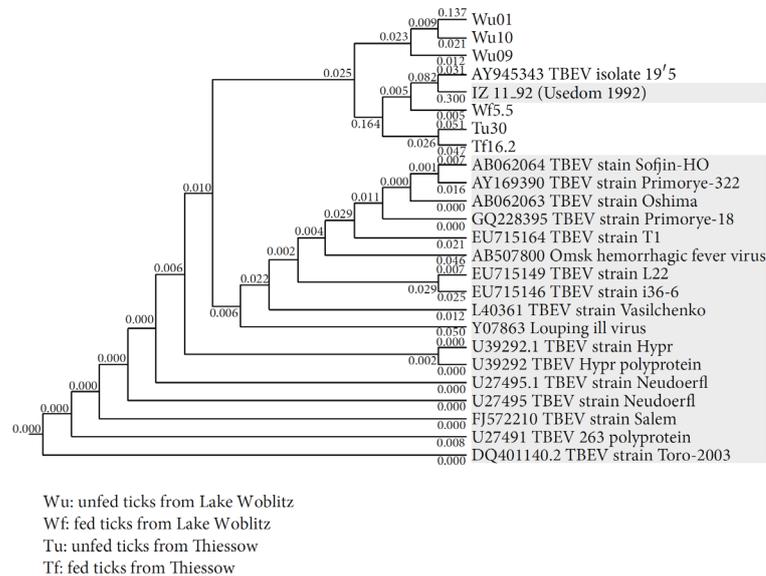


FIGURE 2: Phylogenetic tree (neighbour joining method) for 25 isolates of *Flavivirus*. Branch lengths reflect relative genetic distances between isolates. Figures at branching points represent bootstrap values. Isolate names in grey boxes designate type references for particular genetic assemblages.

Statistical analysis was performed with SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). TBEV prevalence among fed and unfed nymphs from each region was compared using Fisher's exact test.

3. Results

A total of 250 *Ixodes ricinus* nymphs were processed. RNA was isolated from 50 unfed ticks from each region and from those ticks which were alive and intact after feeding (27 from Lake Woblitz, 39 from Thiessow, and 34 from Boldekow).

A total of six ticks (2.4%) were tested positive for TBEV: three of 50 unfed (6%) and one of 27 fed nymphs (3.7%) from Lake Woblitz, along with one of 50 unfed (2%) and one of 39 fed nymphs (2.6%) from Thiessow. Neither fed nor unfed nymphs from Boldekow were TBEV-RNA positive. The difference between the infection rates in fed and unfed ticks was not significant ($P > 0.05$).

The RNA sequences detected were broadly homologous to described TBEV strains, as the phylogenetic analysis shows (Figure 2). The sequence Wu 01 (tick from Lake Woblitz, unfed) was shown to be closely related to the tick-borne encephalitis virus isolates Neudoerfl (U27495.1), Salem (FJ572210.1), Hypr (U39292.1), and Toro-2003 (DQ401140.2) (92% homology in every case).

Wu 09 (Lake Woblitz, unfed) showed 100% homology to the TBEV isolates Neudoerfl, Salem, Hypr, and Toro-2003.

Wu 10 (Lake Woblitz, unfed) showed 98% homology to the TBEV isolates Neudoerfl, Salem, Hypr, and Toro-2003.

Wf 5.5 (Lake Woblitz, fed) showed 100% homology to the TBEV isolates Neudoerfl, Salem, Hypr, and Toro-2003.

Tu 30 (Thiessow, unfed) was 100% homologous to TBEV Hypr and TBEV Toro-2003 and 99% homologous to TBEV Neudoerfl and TBEV Salem.

Tf16.2 (Thiessow, fed) showed 100% homology to the tick-borne encephalitis virus isolates Neudoerfl, Salem, Hypr, and Toro-2003.

The phylogenetic analysis revealed a close relationship of all six positive sequences and a TBEV sequence (IZ11/92) from Mecklenburg-East Pomerania obtained in 1992 (Süss 1997). The results of the phylogenetic analysis of the sequence data are shown in Figure 2.

4. Discussion

Six of 250 ticks (2.4%) were TBE virus-positive in the nested RT-PCR. This is the first proof of natural TBE foci in Mecklenburg-West Pomerania since 1992. In 1992, Süß et al. analyzed 18,760 unengorged ticks subdivided into 260 pools using n-RT-PCR and southern blot hybridization. Two tick pools from the Darss peninsula (near the villages Ahrenshoop and Muggenburg) and three tick pools from the island of Usedom (the villages Ahlbeck, Schmollensee, and Koserow) were found to be TBEV-positive, and one sequence was published (IZ-11/92) [14, 16, 21] (Figure 1). In the aftermath of this study over 16,000 ticks were collected between 1993 and 2003 but none was found to be TBEV-positive, leading to the assumption that natural foci were extinct or only present at an extremely low level of activity (Health

Department of the State of Mecklenburg-West Pomerania, unpublished data) [17].

In 2004, a clinically proven case of TBE infection was reported from a campsite near Groß Quassow on Lake Woblitz [15], and in 2007 we collected and analyzed ticks from this region. Four of 77 (5.2%) ticks were TBEV-positive with nested RT-PCR. In Thiessow in the south-east of the island of Ruegen, where another autochthonous case occurred in 2005, two out of 89 (2.2%) ticks were TBEV-positive with nested RT-PCR. In Boldekow near Anklam where the third autochthonous case was reported, all 84 ticks we investigated tested negative for TBEV.

The TBEV sequences obtained displayed a high level of homology with the European prototype strain Neudoerfl and distinct western TBEV subtype isolates (Figure 2). The close relationship between the sequences we found and the single published sequence from Usedom from the year 1992 (IZ-11/1992) may indicate that the TBEV-foci in Mecklenburg-West Pomerania persisted over the years at low levels of activity. Data for the remaining sequences from 1992 from Usedom and the Darss peninsula are, unfortunately, not available (Figures 1 and 2) [14, 16].

This first evidence of TBEV in ticks for 15 years might be explained by warmer winter temperatures leading to an increase in tick activity [22]. The winter of 2006/2007 was the warmest in Germany since annual temperature statistics began to be recorded in 1901. An average temperature of 4.6°C was measured in Mecklenburg-West Pomerania, a deviation of +4.4°C from the previous longstanding average temperature [23].

A possible explanation for the relatively high prevalence of TBEV-RNA in nymphs in our study compared to the unsuccessful detection of TBEV-RNA in the previous years in Mecklenburg-West Pomerania may lie in the fact that we processed the ticks separately without pooling them. The widespread practice of detecting TBEV-RNA by PCR from pools of 3 to 10 adult ticks or pools of up to 200 nymphs may dilute the total RNA concentration of the specimen below the detection limit. In geographic regions with relatively low TBEV prevalence in particular, this may lead to a distortion of results and a bias towards TBEV-negativity.

The TBEV detection rate has been reported to be up to 21.5 times higher in ticks fed on humans than in unfed ticks [5]. On the basis of these data, we expected the prevalence of TBEV to be higher in our fed ticks due to the hypothetical increase in virus replication during the blood meal. However, we were unable to determine a significant difference in TBEV infection rates in fed versus unfed nymphs for either Lake Woblitz (1 versus 3) or Thiessow (1 versus 1) in our study.

PCR-inhibitors from blood may have biased the results, though according to the DNA and RNA isolation protocol, inhibitors should have been sufficiently eliminated. Cofeeding (feeding closely together on the same animal) has been shown to support virus transmission from infected adults to uninfected nymphs [24, 25] but we did not observe this in our study (which anyway involved the feeding of nymphs only).

Our results imply that natural TBEV foci can latently persist at low levels of activity for years. This is exemplified by the area around Lake Woblitz, near Neustrelitz, which was

a focus of TBE between 1960 and 1985, during which four clinical cases were reported, after which the next case did not occur until 2004 [2, 14, 15]. The close relationship between the sequences reported in this study and a TBEV strain found on the island of Usedom in 1992 supports this hypothesis. Another possible scenario is that TBEV may have reemerged in extinct natural foci through the agency of migrating birds. This hypothesis could also apply to the emergence of TBEV in Thiessow on the island of Ruegen. Together with other coastal areas of Mecklenburg-West Pomerania, Ruegen is a rest stop for more than 27 species of water bird and over five million migratory birds annually along the Atlantic flyway [26]. The theory that migrating birds act as hosts and transport media for ticks could also explain TBE in another setting in South West Germany, where at a monkey park in 2006 a closely related TBEV strain was isolated from the brain tissue of an infected, naturally exposed monkey (*Macaca sylvanus*) [27, 28].

Further studies using unpooled ticks from Mecklenburg-West Pomerania are needed if we are to obtain complete prevalence data for this region and detect possible new risk areas for TBE infection early. Examining TBEV reservoirs, such as mice, goats, and sheep, which can function as sentinels, and returning to explore the natural foci described in 1992 may generate results that would serve as a useful addition to the present data [29].

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

References

- [1] J. Süß and C. Schrader, "Durch Zecken übertragene human-pathogene und bisher als apathogen geltende Mikroorganismen in Europa Teil I: Zecken und Viren," *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, vol. 47, no. 4, pp. 392–404, 2004.
- [2] J. Süß, "Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia—an overview," *Ticks and Tick-Borne Diseases*, vol. 2, no. 1, pp. 2–15, 2011.
- [3] A. Mickiene, A. Laiškonis, G. Günther, S. Vene, A. Lundkvist, and L. Lindquist, "Tickborne Encephalitis in an area of high endemicity in Lithuania: disease severity and long-term prognosis," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 35, no. 6, pp. 650–658, 2002.
- [4] V. Danielová, N. Rudenko, M. Daniel et al., "Extension of Ixodes ricinus ticks and agents of tick-borne diseases in mountain areas in the Czech Republic," *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 296, supplement 40, pp. 48–53, 2006.
- [5] J. Süß, C. Klaus, R. Diller, C. Schrader, N. Wohanka, and U. Abel, "TBE incidence versus virus prevalence and increased prevalence of the TBE virus in Ixodes ricinus removed from humans," *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 296, supplement 1, pp. 63–68, 2006.
- [6] Robert Koch Institut, "FSME: Risikogebiete in Deutschland (Stand Mai 2013)—Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos," *Epidemiologisches Bulletin*, vol. 18, pp. 151–162, 2013.

- [7] Robert-Koch-Institut, *SurvStat*, January 2014, <http://www3.rki.de/SurvStat>.
- [8] H. Holzmann, S. W. Aberle, and K. Stiasny, "Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 15, no. 10, pp. 1671–1673, 2009.
- [9] M. Löbermann, L. G. Gürtler, B. Eichler-Löbermann, and E. C. Reisinger, "Emerging viral diseases in Europe," *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, vol. 137, no. 17, pp. 900–905, 2012.
- [10] T. Skarpaas, U. Ljøstad, and A. Sundøy, "First human case of tickborne encephalitis, Norway," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 10, no. 12, pp. 2241–2243, 2005.
- [11] P. Zeman and C. Benes, "A tick-borne encephalitis ceiling in Central Europe has moved upwards during the last 30 years: possible impact of global warming?" *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 293, supplement 37, pp. 48–54.
- [12] O. Kahl, "Fatal attraction or how do we get tick bites?" *Infection*, vol. 24, no. 5, pp. 394–395, 1996.
- [13] D. Sumilo, A. Bormane, and L. Asokliene, "Socio-economic factors in the differential upsurge of tick-borne encephalitis in central and eastern Europe," *Reviews of Medical Virology*, vol. 18, no. 2, pp. 81–95, 2008.
- [14] J. Süß, R. Sinnecker, and D. Sinnecker, "Epidemiology and ecology of tick-borne encephalitis in the eastern part of Germany between 1960 and 1990 and studies on the dynamics of a natural focus on tick-borne encephalitis," *Zentralblatt für Bakteriologie*, vol. 277, no. 2, pp. 224–235, 1960.
- [15] C. J. Hemmer, M. Littmann, M. Löbermann, M. Lafrenz, T. Böttcher, and E. C. Reisinger, "Tickborne meningoencephalitis, first case after 19 years in northeastern Germany," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 11, no. 4, pp. 633–634, 2005.
- [16] J. Süß, P. Béziat, C. Schrader et al., "Viral zoonosis from the viewpoint of their epidemiological surveillance: tick-borne encephalitis as a model," in *Viral Zoonosis and Food of Animal Origin: A Re-Evaluation of Possible Hazards for Human Health*, O. R. Kaaden, C. P. Czerny, and W. Eichhorn, Eds., pp. 229–243, Springer, New York, NY, USA, 1997.
- [17] C. Klaus, B. Hoffmann, U. Hering et al., "Tick-borne encephalitis (TBE) virus prevalence and virus genome characterization in field-collected ticks (*Ixodes ricinus*) from risk, non-risk and former risk areas of TBE, and in ticks removed from humans in Germany," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 16, no. 3, pp. 238–244, 2010.
- [18] S. Frimmel, A. Krienke, D. Riebold et al., "Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)-Virus bei Menschen und Zecken in Mecklenburg-Vorpommern," *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, vol. 135, no. 27, pp. 1393–1396, 2010.
- [19] E. Demikhovska, S. Sinha, and M. Littmann, "Jahresbericht über die erfassten meldepflichtigen Infektionskrankheiten in Mecklenburg-Vorpommern," pp. 24–26, 2006.
- [20] C. Schrader and J. Süß, "A nested RT-PCR for the detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in natural foci," *Zentralblatt für Bakteriologie*, vol. 289, no. 3, pp. 319–328, 1999.
- [21] J. Süß, R. Béziat, H. P. Rohr, J. Treib, and A. Haass, "Detection of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in several federal "Länder" of Germany by means of the polymerase chain reaction (PCR)—characterization of the virus," *Infection*, vol. 24, no. 5, pp. 403–404, 1996.
- [22] E. Lindgren and R. Gustafson, "Tick-borne encephalitis in Sweden," *The Lancet*, vol. 358, no. 9275, pp. 16–18, 2001.
- [23] U. Kirsche and G. Lux, "Deutschlandwetter im Winter 2006/07-wärmster Winter aller Zeiten," DWD. Pressemitteilung, 2007, <http://www.dwd.de/>.
- [24] M. Labuda, V. Danielova, L. D. Jones, and P. A. Nutall, "Amplification of tick-borne encephalitis virus infection during co-feeding of ticks," *Medical and Veterinary Entomology*, vol. 7, no. 4, pp. 339–342, 1993.
- [25] S. E. Randolph, "Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda's enduring paradigm," *Ticks and Tick-Borne Diseases*, vol. 2, no. 4, pp. 179–182, 2011.
- [26] T. Heinicke and U. Köppen, "Vogelzug in Ostdeutschland I/1, Wasservogel, Entenvogel, Lappen- und Seetaucher, Kormoran, Löffler und Reiher," in *Beringungszentrale Hiddensee, Landesamt für Umwelt, Naturschutz und Geologie Mecklenburg-Vorpommern, Berichte der Vogelwarte Hiddensee* 18, 2007.
- [27] J. Süß, E. Gelpi, and C. Klaus, "Tickborne encephalitis in naturally exposed monkey (*Macaca sylvanus*)," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 13, no. 6, pp. 905–907, 2007.
- [28] J. Waldenström, A. Lundkvist, K. I. Falsk et al., "Migrating birds and tickborne encephalitis virus," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 13, no. 8, pp. 1215–1218, 2007.
- [29] C. Klaus, M. Beer, R. Saier et al., "Goats and sheep as sentinels for tick-borne encephalitis (TBE) virus-epidemiological studies in areas endemic and non-endemic for TBE virus in Germany," *Ticks and Tick Borne Diseases*, vol. 3, no. 1, pp. 27–37, 2012.

Seroprevalence of tick-borne-encephalitis virus in wild game in Mecklenburg-Western Pomerania (north-eastern Germany).

Frimmel S, Leister M, Löbermann M, Feldhusen F, Seelmann M, Süss J, Reisinger EC.

Ticks Tick Borne Dis. 2016; 7: 1151-1154.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Ticks and Tick-borne Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ttbdis

Short communication

Seroprevalence of tick-borne-encephalitis virus in wild game in Mecklenburg-Western Pomerania (north-eastern Germany)

Silvius Frimmel (MD)^{a,*}, Matthias Leister^a, Micha Löbermann^a, Freerk Feldhusen^b, Matthias Seelmann^b, Jochen Süß^c, Emil Christian Reisinger^a^a Department of Tropical Medicine, Infectious Diseases and Nephrology, University of Rostock Medical School, 18055 Rostock, Germany^b State Institute for Agriculture, Food Safety and Fisheries Mecklenburg-Western Pomerania, D-18059 Rostock, Germany^c Tick Information Center, D-07646 Lippersdorf, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 April 2016

Received in revised form 5 August 2016

Accepted 10 August 2016

Available online 10 August 2016

Keywords:

Tick borne encephalitis

Tick borne encephalitis virus

Mecklenburg-Western Pomerania

Wild game

Wild boar

Deer

ABSTRACT

Mecklenburg-Western Pomerania, a federal state in the north east of Germany, has never been a risk area for TBEV infection, but a few autochthonous cases, along with TBEV-RNA detection in ticks, have shown a low level of activity in natural foci of the virus in the past. As wild game and domestic animals have been shown to be useful sentinels for TBEV we examined sera from wild game shot in Mecklenburg-Western Pomerania for the prevalence of TBEV antibodies.

A total of 359 sera from wild game were investigated. All animals were shot in Mecklenburg-Western Pomerania in 2012. Thirteen of 359 sera tested positive or borderline for anti-TBEV-IgG with ELISA and four samples tested positive using NT.

The four TBEV-positive sera confirmed by NT constitute the first detection of TBEV-antibodies in sera of wild game in Mecklenburg-Western Pomerania since 1986–1989. This underlines that the serological examination of wild game can be a useful tool in defining areas of possible TBEV infection, especially in areas of low TBEV-endemicity.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

Tick-borne encephalitis (TBE) is the most widespread tick-transmitted viral disease in central Europe. The TBE virus (TBEV) belongs to the genus *Flavivirus* (Fam. *Flaviviridae*), which has three different subtypes: the European subtype, transmitted mainly by *Ixodes ricinus*, the Siberian subtype and the Far Eastern Subtype, both of which are transmitted mainly by *Ixodes persulcatus* (Süss, 2011).

Wild game and domestic animals usually develop an antibody titer after infection with TBEV without showing specific clinical signs of illness (Nosek et al., 1967; Duscher et al., 2015). These animals are only viremic for a very short time, but as their antibodies persist over a longer period, they are useful sentinels for TBEV (Gerth et al., 1995; Klaus et al., 2012; Jaenson et al., 2012; Balling et al., 2014; Duscher et al., 2015; Imhoff et al., 2015). Furthermore, it has been shown for the Czech Republic that the size of the wild boar population correlates positively with the annual

incidence of TBE. In the Czech Republic, Belgium, Croatia and in other European countries, surveys of wild animal species have successfully been performed to highlight possible risk areas of TBEV transmission (Balling et al., 2014; Kriz et al., 2014; Duscher et al., 2015; Imhoff et al., 2015).

Mecklenburg-Western Pomerania, a federal state in the north east of Germany, has never been declared a risk area according to the definition used by the German public health authority, but a few autochthonous cases, along with TBEV-RNA detection in ticks, have shown a low level of activity in natural foci of the virus in the past. Between 1992 and 2003, a total of 16,089 ticks tested negative for TBEV in Mecklenburg-Western Pomerania and it was thought that TBEV had disappeared from this area (Health Department of the State of Mecklenburg-Western Pomerania, unpublished data; Klaus et al., 2010). In 2004 the first autochthonous case of human TBEV infection for 19 years was reported, to be followed by other autochthonous human cases. Ticks collected from the areas where the human infections occurred were shown to harbour TBEV-RNA for the first time in 15 years (Süss et al., 1992; Hemmer et al., 2005; Robert Koch Institute, 2007; Frimmel et al., 2010, 2014).

From 1986–1989 on the Island of Usedom (in the eastern part of Western Pomerania), 5 of 500 samples of wild boar and deer were seropositive for TBEV (Süss et al., 1992). A recent seroprevalence

* Corresponding author at: Ernst-Heydemann-Strasse 6, D–18057. Rostock, Germany.

E-mail address: silvius.frimmel@med.uni-rostock.de (S. Frimmel).

Table 1
Results and sampling locations of sera tested positive by ELISA and SNT, sorted by positivity using SNT and district.

District	Georeference	Location	Species	ELISA (VIEU) result	ELISA interpretation	SNT result	SNT interpretation
VR	54,4277 12,7696	Zingst	Red deer	166	+	160	+
VR	54,4277 12,7696	Zingst	Fallow deer	166	+	10	+
VG	53,7089 13,9274	Meiersberg	Red deer	188	+	60	+
VG	53,6333 14,0333	Spechtberg	Roe deer	<5	–	20	+
VR	54,4277 12,7696	Zingst	Wild boar	171	+	<10	–
VG	53,4869 14,0334	Pasewalk	Wild boar	152	+	<10	–
VG	53,4869 14,0334	Pasewalk	Wild boar	106	(+)	<10	–
LUP	53,4514 11,1454	Granzin	Wild boar	215	+	<10	–
LUP	53,4738 10,7915	Greven	Wild boar	170	+	<10	–
LUP	53,4738 10,7915	Greven	Wild boar	85	(+)	<10	–
LRO	54,2389 12,2217	Torfbrücke	Red deer	234	+	<10	–
MSE	53,2606 12,5774	Kieve	Red deer	144	+	<10	–
MSE	53,3004 12,8916	Leussow	Fallow deer	70	(+)	<10	–
MSE	53,5000 12,7500	Kargow	Red deer	121	(+)	<10	–

Legend.
Vienna Units (VIEU).
+ positive.
(+) borderline.
– negative.

Administrative districts: Vorpommern-Ruegen (VR), Vorpommern-Greifswald (VG), Ludwigslust-Parchim (LUP), Rostock (LRO), Mecklenburgische Seenplatte (MSE).

study of wild game in Saxony, eastern Germany, showed that high seroprevalence of TBEV in wild game can be found in areas of low TBEV transmission risk (Balling et al., 2014).

We examined sera from wild game shot in Mecklenburg-Western Pomerania for the prevalence of TBEV antibodies in order to update existing data on autochthonous cases and TBEV prevalence in ticks (Hemmer et al., 2005; Frimmel et al., 2014).

2. Materials and methods

A total of 359 sera from wild game were investigated—229 sera from wild boar, 51 from red deer, 24 from roe deer, and 55 from fallow deer. All animals were shot without context to the study in Mecklenburg-Western Pomerania in 2012. The sera were processed and stored as prescribed by law at the State Institute for Agriculture, Food Safety and Fisheries Mecklenburg-Western Pomerania. Serum samples of between 200 and 400 μ l in volume were stored at -80°C in deepwell plates for further examination.

2.1. ELISA

All 359 samples were tested using the “Immunozytm FSME IgG All Species ELISA kit[®]” (Progen, Heidelberg, Germany) according to the manufacturer’s instructions. Results were expressed as Vienna units per ml (VIEU/ml) with <63 VIEU/ml considered negative, between 63 and 126 VIEU/ml as borderline and over 126 VIEU/ml as positive, according to the manufacturer’s recommendations.

2.2. Virus neutralization test (NT)

The virus neutralization test (NT) was performed as described before (Holzmann et al., 1996). NT titers (NT 100) were expressed as

the reciprocal of the serum dilution that was able to suppress virus infection to such an extent that no viral antigen could be detected by ELISA in the supernatant (OD at 450 nm <0.1). The test was repeated twice and the results were averaged. NT100 titers ≥ 10 were considered positive. Each test included titrations of virus as a control in the absence of antibodies, along with three positive and one negative serum controls.

3. Results

3.1. ELISA

Thirteen of 359 sera tested positive or borderline for anti-TBEV-IgG with ELISA (3.6%). Four of 51 serum samples from red deer, four of 229 samples from wild boar and one of 55 samples from fallow deer were ELISA positive. Two wild boar sera and one red and fallow deer serum respectively exhibited borderline reactions in the ELISA (Table 1, Fig. 1).

3.2. Virus neutralization test

As the gold-standard for minimizing false-positive results, NT was performed as a control on the nine ELISA-positive sera, the four ELISA-borderline sera and, additionally, on five randomly chosen sera which were negative according to ELISA. Four samples tested positive using NT. These included two red deer sera and one fallow deer serum, which were all ELISA-positive, and one roe deer serum which had tested negative using ELISA. Detailed results are referred in Table 1 and Fig. 1 (Table 1, Fig. 1).

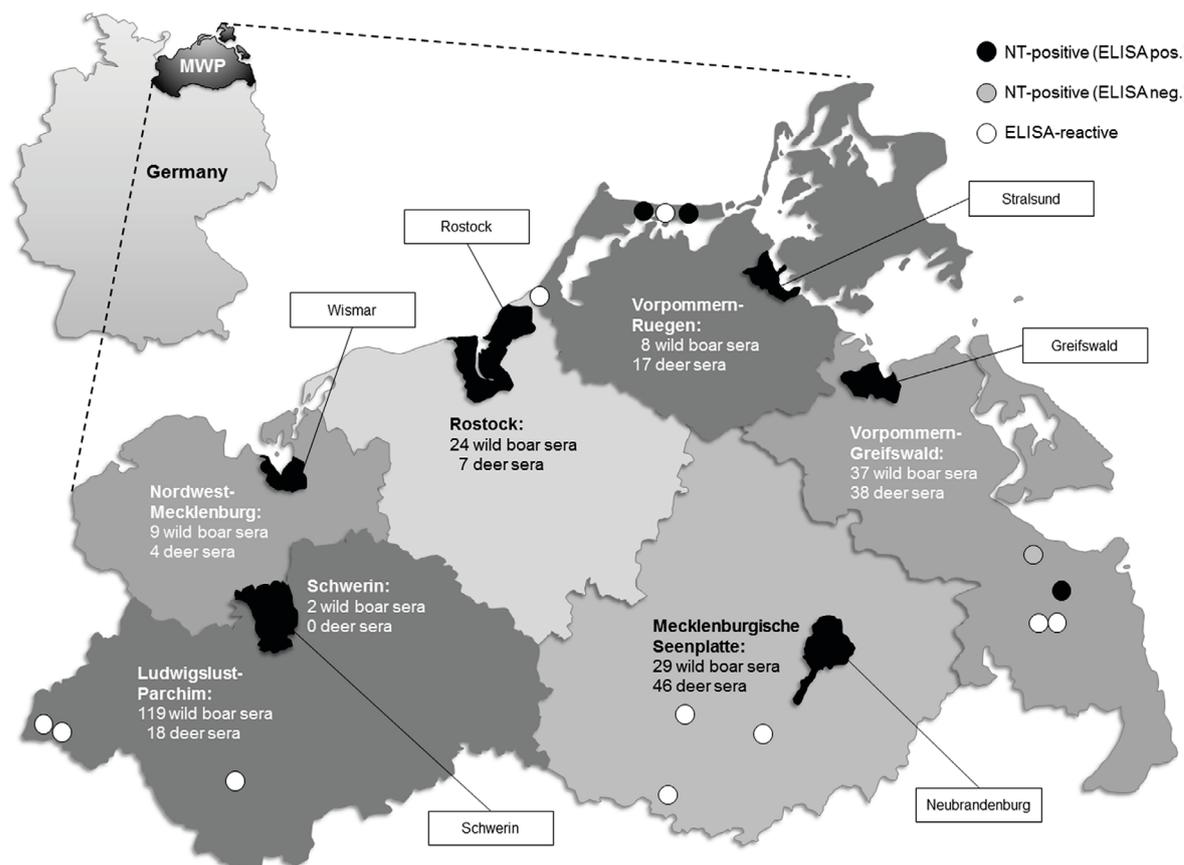


Fig. 1. Map of Mecklenburg-Western Pomerania showing ELISA-reactive and NT-positive serum samples of wild game.

4. Discussion

To the best of our knowledge, the four TBEV-positive sera confirmed by NT constitute the first detection of TBEV-antibodies in sera of wild game in Mecklenburg-Western Pomerania since 1986–1989, when five of 500 samples of deer and wild boar (1%) from the Island of Usedom tested positive for TBEV (Süss et al., 1992). However, as we were only able to obtain one red deer serum from the Island of Usedom, which tested negative, we cannot provide representative data for this region.

In Müggenburg/Zingst on the Darss peninsula the presence of a pool of TBEV-positive ticks was documented in 1992. This natural focus seems to have been active for decades, though no human cases from the peninsula have been yet reported (Süss et al., 1996).

A natural focus of TBEV near Torgelow, close to the German-Polish border, was described for the first time in 1965, when TBEV-antibodies were detected in cow's milk (Apitzsch 1967; Süss et al., 1992; Süss et al., 1997). We found two reactive sera from this area each one in Spechtberg/Torgelow and in Meiersberg in the district Vorpommern-Greifswald (Table 1, Fig. 1). Autochthonous human cases of TBEV-infection have also been documented in the Polish province of Western Pomerania, which borders Mecklenburg-Western Pomerania. However, with an incidence of 0–0.5 per 100,000 inhabitants per year during the period between 2000 and 2010 and the last autochthonous case reported in the year 2012, Western Pomerania is not classified as a risk area (Czarkowski et al., 2013).

As flavivirus antibodies are known to cross-react within serogroups and against other members of the Flaviviridae family

when this particular ELISA is used, all ELISA-positive sera were further tested using NT. Samples which tested positive by ELISA and negative by NT may be explained by cross-reactivity with other Flaviviridae (Wurm et al., 2000; Dobler et al., 2005; Van der Poel et al., 2005; Klaus et al., 2014). Besides cross-reactivity, another explanation for the low number of positive reactions when the wild game sera were subject to NT could be that the samples were often haemolytic as a result of logistical challenges, meaning antibodies might have denatured or the cells used for NT suffered toxic effects which influenced the result of the NT. Haemolysis of serum samples in studies concerning wild game has been reported before (Gerth et al., 1995; Wurm et al., 2000; Imhoff et al., 2015). The fact that one single sample was tested positive using NT, but negative using ELISA may be explained by the sensitivity of the ELISA-kit, which was 57% for goats and sheep; however data for the sensitivity of the test for deer and wild boar are lacking (Klaus et al., 2011; Klaus et al., 2012).

Mecklenburg-Western Pomerania is an area where the risk of TBEV-infection is insignificant but where singular autochthonous cases do occur. TBEV prevalence was revealed here by detection of TBEV-RNA in host-seeking ticks from the areas where the infections were acquired (Frimmel et al., 2010; Robert Koch Institute, 2014). The presence of TBEV-positive antibodies in wild game underlines the notion that the serological examination of game can be a useful tool in defining areas of possible TBEV infection. Cervids distribute ticks across their foraging range of areas of 30 km² and larger (Gerth et al., 1995; Imhoff et al., 2015). The larger area of activity in comparison with small mammals may represent an advantage for being

sentinels in areas of low TBEV-endemicity (Achazi et al., 2011; Jaenson et al., 2012; Balling et al., 2014; Imhoff et al., 2015)

Returning to explore the natural foci described in 1992 and a serologic survey of other sentinels as livestock may generate results that would serve as a useful addition to the present data.

Acknowledgements

We would like to thank Prof. F. X. Heinz, Vienna for confirmatory testing of sera by NT.

References

- Achazi, K., Ruzek, D., Donoso-Mantke, O., Schlegel, M., Ali, H.S., Wenk, M., Schmidt-Chanasit, J., Ohlmeyer, L., Rühle, F., Vor, T., Kiffner, C., Kallies, R., Ulrich, R.G., Niedrig, M., 2011. Rodents as sentinels for the prevalence of tick-borne encephalitis virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 641–647.
- Apitzsch, L., 1967. Zecken- und Virusaktivität im Herdgebiet von Torgelow in den Jahren 1960 bis 1965. *Z. Ges. Hyg.* 13, 261–267.
- Balling, A., Plessow, U., Beer, M., Pfeffer, M., 2014. Prevalence of antibodies against tick-borne encephalitis virus in wild game from Saxony, Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 5, 805–809.
- Czarkowski, M.P., Cielebań, E., Kondej, B., Staszewska, E., 2013. National institute of public health—national institute of hygiene—department of epidemiology, 2014. *Infect. Dis. Poisonings Poland* in 60.
- Dobler, G., Treib, J., Kiessig, S.T., Blohn, W.V., Frösner, G., Haass, A., 2005. Diagnosis of tickborne encephalitis: evaluation of sera with borderline titers with the TBE-ELISA. *Infection* 24, 405–406.
- Duscher, G.G., Wetscher, M., Baumgartner, R., Walder, G., 2015. Roe deer sera used for TBE surveillance in Austria. *Ticks Tick Borne Dis.* 6, 489–493.
- Frimmel, S., Krienke, A., Riebold, D., Löbermann, M., Littmann, M., Fiedler, K., Süß, J., Reisinger, E.C., 2010. Tick-borne encephalitis virus in humans and ticks in Northeastern Germany. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 135, 1393–1396.
- Frimmel, S., Krienke, A., Riebold, D., Löbermann, M., Littmann, M., Fiedler, K., Süß, J., Reisinger, E.C., 2014. Tick-borne encephalitis virus habitats in North East Germany: reemergence of TBEV in ticks after 15 years of inactivity. *Biomed. Res. Int.* 2014, 308371.
- Gerth, H.J., Grimshandl, D., Stage, B., Doller, G., Kunz, C., 1995. Roe deer as sentinels for endemicity of tick-borne encephalitis virus. *Epidemiol. Infect.* 115, 355–365.
- Hemmer, C.J., Littmann, M., Löbermann, M., Lafrenz, M., Böttcher, T., Reisinger, E.C., 2005. Tickborne meningoencephalitis, first case after 19 years in northeastern Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 633–634.
- Holzmann, H., Kundi, M., Stiasny, K., Clement, J., Kunz, C., Heinz, F.X., 1996. Correlation between ELISA, hemagglutinin inhibition, and neutralization tests after vaccination against tick-borne encephalitis. *J. Med. Virol.* 48, 102–107.
- Imhoff, M., Hagedorn, P., Schulze, Y., Hellenbrand, W., Pfeffer, M., Niedrig, M., 2015. Review: sentinels of tick-borne encephalitis risk. *Ticks Tick Borne Dis.* 6, 592–600.
- Jaenson, T.G., Jaenson, D.G., Eisen, L., Petersson, E., Lindgren, E., 2012. Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the past 30 years in Sweden. *Parasit Vectors* 5 (8), 1–15.
- Klaus, C., Hoffmann, B., Hering, U., Mielke, B., Sachse, K., Beer, M., Süß, J., 2010. Tick-borne encephalitis (TBE) virus prevalence and virus genome characterization in field-collected ticks (*Ixodes ricinus*) from risk non-risk and former risk areas of TBE, and in ticks removed from humans in Germany. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 238–244.
- Klaus, C., Beer, M., Saier, R., Schubert, H., Bischoff, S., Süß, J., 2011. Evaluation of serological tests for detecting tick-borne encephalitis virus (TBEV) antibodies in animals. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 124, 443–449.
- Klaus, C., Beer, M., Saier, R., Schau, U., Moog, U., Hoffmann, B., Diller, R., Süß, J., 2012. Goats and sheep as sentinels for tick-borne encephalitis (TBE) virus—epidemiological studies in areas endemic and non-endemic for TBE virus in Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 3, 27–37.
- Klaus, C., Ziegler, U., Kalthoff, D., Hoffmann, B., Beer, M., 2014. Tick-borne encephalitis virus (TBEV)—findings on cross reactivity and longevity of TBEV antibodies in animal sera. *BMC Vet. Res.* 10, 78.
- Kriz, B., Daniel, M., Benes, C., Maly, M., 2014. The role of wild game (wild boar and roe deer) in the spread of tick-borne encephalitis in the Czech Republic. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 14, 801–807.
- Nosek, J., Kozuch, O., Ernek, E., Lichard, M., 1967. Übertragung des Zeckenencephalitis-Virus (TBE) durch die Weibchen von *Ixodes ricinus* und Nymphen von *Haemaphysalis inermis* auf die Rehkitzen (*Capreolus capreolus*). *Zentralbl. Bakteriol. Orig.* 203, 162–166.
- Robert Koch Institute, 2007. FSME: Risikogebiete in Deutschland. *Epid. Bull.* 15, 129–135.
- Robert Koch Institute, 2014. FSME: Risikogebiete in Deutschland. *Epid. Bull.* 17, 121–133.
- Süß, J., Sinnecker, R., Sinnecker, D., Berndt, E., Zilske, G., Dedek, G., Apitzsch, L., 1992. Epidemiology and ecology of tick-borne encephalitis in the eastern part of Germany between 1960 and 1990 and studies on the dynamics of a natural focus on tick-borne encephalitis. *Zentralbl. Bakt.* 277, 224–235.
- Süß, J., Béziat, R., Rohr, H.P., Treib, J., Haass, A., 1996. Detection of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in several federal Länder of Germany by means of the polymerase chain reaction (PCR)—characterization of the virus. *Infection* 24, 403–404.
- Süß, J., Béziat, P., Schrader, C., 1997. Viral zoonosis from the viewpoint of their epidemiological surveillance: tick-borne encephalitis as a model. In: Kaaden, O.R., Czerny, C.P., Eichhorn, W. (Eds.), *Viral Zoonosis and Food of Animal Origin—A Re-evaluation of Possible Hazards for Human Health*. Springer Verlag, Wien-New York, pp. 229–243.
- Süß, J., 2011. Tick-borne encephalitis 2010 epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia—an overview. *Ticks Tick Borne Dis.* 2, 2–15.
- Van der Poel, W.H., Van der Heide, R., Bakker, D., De Looft, M., De Jong, J., Van Manen, N., Gaasenbeek, C.P., Borgsteede, F.H., 2005. Attempt to detect evidence for tick-borne encephalitis virus in ticks and mammalian wildlife in The Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 5, 58–64.
- Wurm, R., Dobler, G., Peters, M., Kiessig, S.T., 2000. Serological investigations of redfoxes (*Vulpes vulpes* L.) for determination of the spread of tick-borne encephalitis in Northrhine-Westphalia. *J. Vet. Med. B. Infect. Vet. Public Health* 47, 503–509.

Detection of tick-borne encephalitis virus antibodies in sera of sheep and goats in Mecklenburg-Western Pomerania (north-eastern Germany).

Frimmel S, Löbermann M, Feldhusen F, Seelmann M, Stiasny K, Süss J, Reisinger EC.

Ticks Tick Borne Dis. 2019 Apr 14. pii: S1877-959X(19)30068-8. doi:
10.1016/j.ttbdis.2019.04.012.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Ticks and Tick-borne Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ttbdis

Original article

Detection of tick-borne encephalitis virus antibodies in sera of sheep and goats in Mecklenburg-Western Pomerania (north-eastern Germany)

Silvius Frimmel^{a,*}, Micha Löbermann^a, Frerk Feldhusen^b, Matthias Seelmann^b, Karin Stiasny^c, Jochen Süß^d, Emil Christian Reisinger^a

^a Department of Tropical Medicine, Infectious Diseases and Nephrology, University of Rostock Medical School, 18055 Rostock, Germany

^b State Institute for Agriculture, Food Safety and Fisheries Mecklenburg-Western Pomerania, D-18059 Rostock, Germany

^c Center for Virology, Medical University of Vienna, A-1090 Vienna, Austria

^d Brehm Memorial Center Renthendorf, 07646 Renthendorf, Germany

1. Introduction

Tick-borne encephalitis (TBE) is the most widespread arthropod-borne viral disease in central Europe. The TBE virus (TBEV) belongs to the genus *Flavivirus* (family *Flaviviridae*), and has three different subtypes: the European subtype, transmitted mainly by *Ixodes ricinus*, the Siberian subtype and the Far Eastern subtype, which are mainly transmitted by *Ixodes persulcatus* (Süss, 2011). In nature, the virus circulates between tick vectors and their vertebrate hosts, within in geographically defined foci (Dobler et al., 2011). TBEV also can be transmitted by ingestion of unpasteurized milk or milk products from infected domestic animals, such as goats, sheep or cows. Alimentary TBEV infections and outbreaks have been linked in the past to unpasteurized dairy products, and are still reported today in many European countries (Apitzsch, 1967; Holzmann et al., 2009; Hudopisk et al., 2013; Markovinović et al., 2016; Brockmann et al., 2018; Kerlik et al., 2018).

None of the districts in Mecklenburg-Western Pomerania, one of the most popular holiday regions in Germany, has ever been declared a risk area for TBE, according to the definition used by the German public health authority. However, a handful of autochthonous cases, coupled with TBEV-RNA detection in ticks, have shown activity in natural foci of the virus. In the 1960s and 1970s, foci of TBE virus were well known to be active in Mecklenburg-Western Pomerania and human cases were reported regularly (Apitzsch, 1965, 1967; Süß et al., 1992). In 2004, the first autochthonous case of human TBEV infection for 19 years was reported, and was followed by several further autochthonous human cases (Hemmer et al., 2005; Frimmel et al., 2010). In 2007, TBEV-RNA in questing ticks in Mecklenburg-Western Pomerania was detected for the first time since 1992 and four serum samples from wild game shot in 2012 tested positive in a virus neutralization test, thus proving activity of natural foci of TBEV in Mecklenburg-Western Pomerania (Frimmel et al., 2014, 2016).

In regions of low TBE prevalence, sentinel animals are an excellent

way of assessing the risk of TBEV infection. In contrast to the established method of detecting natural foci by collecting and analyzing ticks, which is time consuming, expensive and often ineffective (Klaus et al., 2012; Balling et al., 2014; Imhoff et al., 2015; Frimmel et al., 2016), serological survey of sheep and goats is easier and may be more effective. TBE infections result in long-term immunity but are rarely clinically apparent in Bovidae. However, it has been proven that these animals carry specific antibodies following a TBEV infection and, using ELISA and NT, TBEV-specific antibodies can be reliably detected in serum for many years post-infection (Klaus et al., 2012, 2014; Imhoff et al., 2015). Moreover, because herds of sheep and goat are sedentary and stay only in their designated fields, they are likely optimal sentinels for TBE risk areas. In summary, assessing seroprevalence in free-ranging animals, especially in sheep and goats, is a valuable and informative technique to identify patterns in TBEV foci, to describe the epidemiological situation and to identify areas of risk, even in regions of low TBE prevalence, such as Mecklenburg-Western Pomerania (Klaus et al., 2012, 2014).

We examined sera from livestock (goats and sheep) from Mecklenburg-Western Pomerania for the presence of TBEV-specific antibodies to complement the data obtained in previous studies regarding ticks and wild game, concentrating on regions with former proof of TBEV activity (Frimmel et al., 2010, 2016).

2. Material and methods

2.1. Serum samples

A total of 479 sera from livestock were investigated: 375 from sheep and 104 sera from goats. All sera were obtained for routine examination, with no reference to this current study, from 18 farms in Mecklenburg-Western Pomerania between 2014 and 2017. Samples were selected from sites with previous evidence of human cases of TBE, seropositive wild game or known former natural foci. Between two and

* Corresponding author.

E-mail address: silvius.frimmel@med.uni-rostock.de (S. Frimmel).

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.04.012>

Received 22 February 2019; Received in revised form 3 April 2019; Accepted 10 April 2019

1877-959X/ © 2019 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Please cite this article as: Silvius Frimmel, et al., Ticks and Tick-borne Diseases, <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.04.012>

60 serum samples were collected from each farm. Blood specimens were drawn by local veterinarians and were sent to the State Institute for Agriculture, Food Safety and Fisheries Mecklenburg-Western Pomerania for surveillance of epizootic diseases. The sera were processed and stored at the State Institute. Serum samples of between 200 and 400 µl in volume were stored at -20 °C in deep well plates and transferred in 2-ml Eppendorf tubes for further examination in our study.

2.2. ELISA

All 479 samples were tested using the “Immunozytm FSME IgG All Species ELISA kit®” (Progen, Heidelberg, Germany) according to the manufacturer’s instructions. Results were expressed as Vienna units per ml (VIEU/ml) with < 63 VIEU/ml considered negative, between 63 and 126 VIEU/ml as borderline and above 126 VIEU/ml as positive, as per the manufacturer’s recommendations.

2.3. Virus Neutralization Test (NT)

As the gold-standard for minimizing false-positive results and to detect positive sera that tested borderline with ELISA, a virus NT was performed as a control on the eleven ELISA-borderline sera and, additionally, on ten randomly chosen sera which were negative according to ELISA. The virus neutralization test was performed using baby hamster kidney (BHK) cells and TBEV (strain Neudoerfl) as described before (Stiasny et al., 2009). Heat-inactivated serum samples were incubated with TBEV for 1 h at 37 °C. Cells were added and incubation was continued for three days. The presence of virus in the cell culture supernatant was assessed by a sandwich ELISA as described previously (Heinz et al., 1986), using guinea pig anti-TBE IgG as capturing antibody and rabbit anti-TBE IgG in combination with horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit IgG from donkey (GE healthcare) as the detection system. The virus neutralization titer was defined as the reciprocal of the sample dilution that showed a 90% reduction in the absorbance readout compared to the control without antibody. NT titers ≥ 10 were considered positive.

3. Results

3.1. ELISA

In the ELISA tests, eleven of 479 sera tested borderline for anti-TBEV-IgG (2.3%). Nine of 375 serum samples from sheep (2.4%), and two of 104 samples from goats (1.9%) were borderline. None of the sera tested positive (Table 1, Fig. 1).

3.2. Virus Neutralization Test

Two samples of sheep sera tested positive using NT. One sample from the year 2014 from a flock in the administrative district Mecklenburgische Seenplatte, and one sample from the district Vorpommern-Greifswald from the year 2016. Detailed results are shown in Table 1 and Fig. 1.

4. Discussion

To the best of our knowledge, the two TBEV-positive sera confirmed by NT constitute the first detection of TBEV-specific antibodies in sera of livestock in Mecklenburg-Western Pomerania since 1965, when antibodies detected in cow’s milk revealed the possible source of an outbreak of TBE in a natural focus of TBE (Apitzsch, 1965,1967; Süß et al., 1992). We found one reactive sheep serum from this area near Torgelow in the Vorpommern-Greifswald district (Table 1, Fig. 1). Interestingly, in our previous study regarding wild game, two reactive sera were found in this region, illustrating stable activity of TBEV in this region (Frimmel et al., 2016, Fig. 1).

The other serum that tested positive by NT was obtained from the community Blumenholz/Weisdin, near Neustrelitz in the Mecklenburgische Seenplatte district (Table 1, Fig. 1). Between 1960 and 1985, several human cases have of TBE were reported in this area (Süß et al., 1992). The first autochthonous human case in Mecklenburg-Western Pomerania for 19 years occurred in 2004, about 20 km away from Blumenholz (Hemmer et al., 2005). In 2007, TBEV-RNA was detected in ticks at the where the infection was acquired (Frimmel et al., 2010).

Sheep and goats are valuable sentinels for TBE (Klaus et al., 2012). The number of seropositive animals seems to correlate with the number of positive ticks and human cases of TBE in regions of relatively high TBE-prevalence (Juceviciene et al., 2005). The larger and defined area of activity in comparison with small mammals or wild game may represent an advantage for being sentinels in areas of low TBEV-endemicity (Klaus et al., 2012; Balling, et al., 2014; Imhoff et al., 2015). The relatively low rate of positive sera in our study can be explained by the observation, that seroprevalence in sheep and goats varies greatly between individual flocks, with the highest rates measured in or close to recognized foci. Small rodents, which are considered to be amplifier and bridge hosts for TBEV may have higher Seroprevalence rates, even in non-risk areas (Imhoff et al., 2015; Rielle et al., 2017)

In Mecklenburg-Western Pomerania, the risk of TBEV-infection is low but singular autochthonous cases do occur. The existence of active foci was proven by detection of TBEV-RNA in host-seeking ticks from the areas where the infections were acquired (Frimmel et al., 2010).

Table 1
Results and sampling locations of sera tested positive by ELISA and NT, sorted by positivity using NT and district.

District	Location/community	Species	ELISA (VIEU) result	ELISA interpretation	NT result	NT interpretation	Year
MSE	Blumenholz	Sheep	82	Borderline	30	+	2014
VG	Torgelow	Sheep	117	Borderline	10	+	2016
VR	Putbus	Sheep	69	Borderline	< 10	-	2014
VR	Putbus	Sheep	63	Borderline	< 10	-	2014
VR	Putbus	Sheep	78	Borderline	< 10	-	2014
VG	Stolpe	Sheep	79	Borderline	< 10	-	2014
VG	Stolpe	Sheep	71	Borderline	< 10	-	2014
VG	Ueckermünde	Goat	108	Borderline	< 10	-	2014
VG	Ueckermünde	Sheep	76	Borderline	< 10	-	2016
VG	Stolpe	Sheep	67	Borderline	< 10	-	2015
MSE	Neustrelitz	Goat	96	Borderline	< 10	-	2016

Vienna Units (VIEU).

+ positive.

- negative.

Administrative districts: Mecklenburgische Seenplatte (MSE), Vorpommern-Greifswald (VG), Vorpommern-Ruegen (VR).

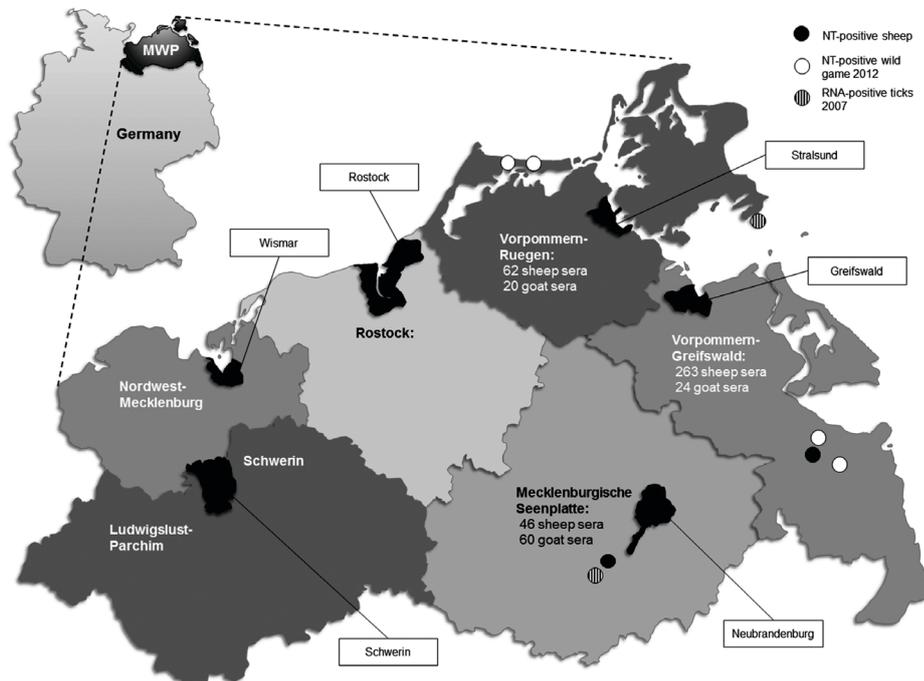


Fig. 1. Map of Mecklenburg-Western Pomerania showing NT-positive serum samples of sheep from the present study, NT-positive serum samples from wild game from 2012 and TBEV-RNA-positive ticks from 2007.

The presence of TBEV-specific antibodies in livestock animals underlines that the serological examination of domestic animals like sheep and goats can be a useful tool in defining areas of possible TBEV infection within low-risk regions. A similar conclusion was drawn by Salat et al. from Romania, where a relatively high number of TBEV-positive sheep was found, but only a few human cases are reported annually (Salat et al., 2017). We are aware that the number of animals tested in our study is relatively small. However, the positive data are highly encouraging and provide a convincing argument that further investigations of livestock, using a larger sample base and covering more western regions of Mecklenburg-Western Pomerania should be carried out. These data are of significant epidemiological interest, not least when we consider that Mecklenburg-Western Pomerania is one of the most popular tourist destinations in Germany, with about 30 million overnight stays per year (Federal Statistical Office, 2018).

The serological survey of livestock, wild game or smaller animals, such as rodents, is a promising technique for detecting new areas where TBEV may be endemic; the animals in question are valuable sentinels for regions with low prevalence (Achazi et al., 2011; Klaus et al., 2012; Balling et al., 2014; Imhoff et al., 2015; Zöldi et al., 2015; Frimmel et al., 2016). Returning to explore the natural foci described in 1992 may generate results that would serve as a useful addition to the present data, through the selective flagging and examination of ticks nearby the positive tested herds.

Funding

This study was funded by a research grant (tracking number WI243519) from Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Germany.

References

- Achazi, K., Růžek, D., Donoso-Mantke, O., Schlegel, M., Ali, H.S., Wenk, M., Schmidt-Chanasit, J., Ohlmeyer, L., Rühle, F., Vor, T., Kiffner, C., Kallies, R., Ulrich, R.G., Niedrig, M., 2011. Rodents as sentinels for the prevalence of tick-borne encephalitis virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11 (6), 641–647. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0236>.
- Apitzsch, L., 1965. Untersuchung über Reservoir der Zeckenzephalitis und ihre epidemiologische Bedeutung im Herdgebiet „Torgelow“. *Z. Gesamte Hyg.* 11, 65–74.
- Apitzsch, L., 1967. Zecken- und Virusaktivität im Herdgebiet von Torgelow in den Jahren 1960 bis 1965. *Z. Gesamte Hyg.* 13, 261–267.
- Balling, A., Plessow, U., Beer, M., Pfeffer, M., 2014. Prevalence of antibodies against tick-borne encephalitis virus in wild game from Saxony, Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 5 (6), 805–809. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.06.007>.
- Brockmann, S.O., Oehme, R., Buckenmaier, T., Beer, M., Jeffery-Smith, A., Spannenkrebs, M., Haag-Milz, S., Wagner-Wiening, C., Schlegel, C., Fritz, J., Zange, S., Bestehorn, M., Lindau, A., Hoffmann, D., Tiberi, S., Mackenstedt, U., Dobler, G., 2018. A cluster of two human cases of tick-borne encephalitis (TBE) transmitted by unpasteurised goat milk and cheese in Germany, May 2016. *Euro Surveill.* 23 (15). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.15.17-00336>.
- Dobler, G., Hufert, F., Pfeffer, M., Essbauer, S., 2011. Tick-borne encephalitis: from microfocus to human disease. *progress in parasitology. Parasitol. Res. Monogr.* 2, 323–331.
- Federal Statistical Office Mecklenburg-Western Pomerania (Statistisches Amt Mecklenburg-Vorpommern, Schwerin), 2018. Tourismus in Mecklenburg-Vorpommern Dezember 2017, Jahr 2017 (endgültige Ergebnisse).
- Frimmel, S., Krienke, A., Riebold, D., Löbermann, M., Littmann, M., Fiedler, K., Klaus, C., Süß, J., Reisinger, E.C., 2010. Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus bei Menschen und Zecken in Mecklenburg-Vorpommern. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 135 (27), 1393–1396. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1262424>.
- Frimmel, S., Krienke, A., Riebold, D., Löbermann, M., Littmann, M., Fiedler, K., Klaus, C., Süß, J., Reisinger, E.C., 2014. Tick-borne encephalitis virus habitats in North East Germany: reemergence of TBEV in ticks after 15 years of inactivity. *Biomed. Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2014/308371>.
- Frimmel, S., Leister, M., Löbermann, M., Feldhusen, F., Seelmann, M., Süß, J., Reisinger, E.C., 2016. Seroprevalence of tick-borne encephalitis virus in wild game in Mecklenburg-Western Pomerania (north-eastern Germany). *Ticks Tick. Dis.* 7 (6), 1151–1154. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.08.004>.
- Heinz, F.X., Tuma, W., Guirakho, F., Kunz, C., 1986. A model study of the use of monoclonal antibodies in capture enzyme immunoassays for antigen quantification exploiting the epitope map of tick-borne encephalitis virus. *J. Biol. Stand.* 14,

- 133–141.
- Hemmer, C.J., Littmann, M., Löbermann, M., Lafrenz, M., Böttcher, T., Reisinger, E.C., 2005. Tickborne meningoencephalitis, first case after 19 years in northeastern Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 633–634.
- Holzmann, H., Aberle, S.W., Stiasny, K., Werner, P., Mischak, A., Zainer, B., Netzer, M., Koppi, S., Bechter, E., Heinz, F.X., 2009. Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1671–1673.
- Hudopisk, N., Korva, M., Janet, E., Smetinger, M., Grgič-Vitek, M., Gubenšek, J., Natek, V., Kraigher, A., Strle, F., Avšič-Županc, T., 2013. Tick-borne Encephalitis Associated with Consumption of Raw Goat Milk, Slovenia, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 19 (5), 806–808. <https://doi.org/10.3201/eid1905.121442>.
- Imhoff, M., Hagedorn, P., Schulze, Y., Hellenbrand, W., Pfeffer, M., Niedrig, M., 2015. Review: sentinels of tick-borne encephalitis risk. *Ticks Tick. Dis.* 6 (5), 592–600. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.05.001>.
- Juceviciene, A., Zygutiene, M., Leinikki, P., Brummer-Korvenkontio, H., Salminen, M., Han, X., Vapalahti, O., 2005. Tick-borne encephalitis virus infections in Lithuanian domestic animals and ticks. *Scand. J. Infect. Dis.* 37 (10), 742–746.
- Kerlik, J., Avdičová, M., Štefkovičová, M., Tarkovská, V., Pántiková Valachová, M., Molčányi, T., Mezencev, R., 2018. Slovakia reports highest occurrence of alimentary tick-borne encephalitis in Europe: analysis of tick-borne encephalitis outbreaks in Slovakia during 2007–2016. *Travel Med. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2018.07.001>.
- Klaus, C., Beer, M., Saier, R., Schau, U., Moog, U., Hoffmann, B., Diller, R., Süss, J., 2012. Goats and sheep as sentinels for tick-borne encephalitis (TBE) virus–epidemiological studies in areas endemic and non-endemic for TBE virus in Germany. *Ticks Tick. Dis.* 3 (1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2011.09.011>.
- Klaus, C., Ziegler, U., Kalthoff, D., Hoffmann, B., Beer, M., 2014. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) – findings on cross reactivity and longevity of TBEV antibodies in animal sera. *BMC Vet. Res.* 10 (78). <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-78>.
- Markovinović, L., Kosanović Ličina, M.L., Tešić, V., Vojvodić, D., Vladušić Lucić, I., Kniewald, T., Vukas, T., Kutleša, M., Krajinović, L.C., 2016. An outbreak of tick-borne encephalitis associated with raw goat milk and cheese consumption, Croatia, 2015. *Infection* 44 (5), 661–665. <https://doi.org/10.1007/s15010-016-0917-8>.
- Rieille, N., Klaus, C., Hoffmann, D., Péter, O., Voordouw, M.J., 2017. Goats as sentinel hosts for the detection of tick-borne encephalitis risk areas in the Canton of Valais, Switzerland. *BMC Vet. Res.* 13 (1), 217. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1136-y>.
- Salat, J., Mihalca, A.D., Mihaiu, M., Modrý, D., Ruzek, D., 2017. Tick-Borne Encephalitis in Sheep, Romania. *Emerg. Infect. Dis.* 23 (12), 2065–2067. <https://doi.org/10.3201/eid2312.170166>.
- Stiasny, K., Holzmann, H., Heinz, F.X., 2009. Characteristics of antibody responses in tick-borne encephalitis vaccination breakthroughs. *Vaccine* 27, 7021–7026.
- Süss, J., 2011. Tick-borne encephalitis 2010 epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia—an overview. *Ticks Tick. Dis.* 2, 2–15.
- Süss, J., Sinnecker, R., Sinnecker, D., Berndt, E., Zilske, G., Dedek, G., Apitzsch, L., 1992. Epidemiology and ecology of tick-borne encephalitis in the eastern part of Germany between 1960 and 1990 and studies on the dynamics of a natural focus on tick-borne encephalitis. *Zentralbl. Bakt.* 277, 224–235.
- Zöldi, V., Papp, T., Reiczigel, J., Egyed, L., 2015. Bank voles show high seropositivity rates in a natural TBEV focus in Hungary. *Infect. Dis. (Lond.)* 47 (3), 178–181. <https://doi.org/10.3109/00365548.2014.975743>.

Abducens nerve palsy following a tick bite: a case report.

Frimmel S, Löbermann M, Buxton B, Reisinger EC.

Int J Med Microbiol. 2006 May; 296 Suppl 40: 304-305.



SHORT COMMUNICATION

Abducens nerve palsy following a tick bite: A case report

Silvius Frimmel^a, Micha Löbermann^a, Ben Buxton^b, Emil C. Reisinger^{a,*}

^a*Division of Tropical Medicine and Infectious Diseases, Department of Medicine, University of Rostock, Medical School, Ernst-Heydemann-Strasse 6, D-18055 Rostock, Germany*

^b*East Tennessee State University, Medical School, Tennessee, USA*

Abstract

Neuromuscular paralysis caused by salivary proteins of ticks is a well-known complication after tick bites in Australia, North America, and South Africa. Symptoms may include general weakness, difficulty walking, ascending paralysis, and bulbar paralysis with diplopia, culminating in respiratory failure. In Europe, toxin-mediated paralysis has rarely been noted. We report a case of cranial nerve paralysis with delayed onset after a tick bite in northern Germany. © 2006 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Tick paralysis; Cranial nerves; Germany; Europe; Eschar

Introduction

Besides an anesthetic effect, some tick salivary gland proteins secreted during feeding have toxic effects on the host. These toxins may lead to local inflammation and eschar, febrile illness, or even paralysis. Tick paralysis initially presents with vague complaints such as irritability, fatigue, pain, paresthesia or ataxic gait, up to 1 day prior to onset of paralysis. Without removal of the tick, symmetrical flaccid paralysis ascends to the upper limbs within 12–24 h. This is followed by bulbar paralysis with dysarthria, dysphagia, and lingual, facial, or ocular paralysis (Rose, 1954; Grattan-Smith et al., 1997; Dworkin et al., 1999; Torres and Schlossberg, 2000; Miller, 2002; Vedanarayanan et al., 2002, 2004; Mans et al., 2003). In cases of isolated peripheral nerve paralysis, the palsy is usually present at the time of tick discovery. Respiratory failure due to paralysis may result in death. Upon removal of the ticks, patients' recovery is usually spontaneous within hours in North America (Rose, 1954; Dworkin et al., 1999). However, retarded recovery lasting days or even weeks after tick

removal were reported from Australia (Grattan-Smith et al., 1997; Miller, 2002). Delayed onset of cranial nerve paralysis has been reported with paralysis presenting 1 day after tick removal.

Worldwide, 80 tick species are estimated to carry toxic salivary gland proteins and 43 tick species are known to produce a neurotoxin similar to the botulinum toxin. Most of the reported cases were in Australia or North America (Mans et al., 2003; Vedanarayanan et al., 2004). A recent analysis of tick toxins suggests that tick toxicoses do not have a common origin within the tick lineage (Mans et al., 2003).

We report the case of a 47-year-old man from northern Germany who presented with a typical eschar and sudden onset of diplopia after a tick bite.

Case report

A 47-year-old man from northern Germany was admitted to hospital with diplopia, blurred vision, dizziness, and difficulty walking beginning 2 days before

*Corresponding author. Tel.: +49 381 494 7511; fax: +49 381 494 7509.
E-mail address: emil.reisinger@medizin.uni-rostock.de (E.C. Reisinger).

presentation. He reported having removed a feeding tick from his right leg 2 days earlier. At presentation, an inflammatory skin lesion on the right tibia presented as a typical eschar, surrounded by an erythematous margin 4 cm in diameter. Unfortunately, the tick could not be identified. Ophthalmologic examination revealed an abducens nerve palsy on the right-hand side. An instable gait and a positive Romberg test were present, but no paresthesia was detected. The muscle tone and deep peripheral tendon reflexes were normal. Clinical examination was otherwise normal. The patient had no history of travel during the previous 6 months. His medical history included abuse of alcohol and nicotine until 3 years prior to presentation.

Blood laboratory examinations revealed a hemoglobin of 8.3 mmol/l (normal: 8.6–12), hematocrit 0.38 (0.4–0.51), MCV 101.1 fl (83–93), MCH 2.22 fmol (1.55–1.9), LDH 301 U/l (<248) and ASAT 51.4 U/l (<35). All other routine laboratory parameters including thyroid gland parameters and urine analysis were normal.

Abdominal ultrasound, ECG, chest X-ray, cranial CT scans, and cranial magnetic resonance imaging (MRI) did not reveal any pathologic findings.

ELISA and immunoblot for *Borrelia burgdorferi*, tick-borne encephalitis (TBE) antibodies in the serum and blood smears for *Ehrlichia* sp. and *Babesia* sp. were negative.

After 4 days, the diplopia and the instable gait improved spontaneously, the Romberg test became negative, and the patient was discharged without sequelae.

Discussion

In Australia, tick paralysis is fairly well known with the hard tick *Ixodes holocyclus* being responsible for most cases. About 20,000 domestic animals are affected by tick paralysis each year, human cases, however, have been rare. Twenty human deaths from envenomation were reported in Australia before 1945, and five cases of severe tick paralysis in children were reported in the Sydney metropolitan area 1972–1995 (Grattan-Smith et al., 1997; Miller, 2002). In the US, nearly 100 human cases of tick-borne paralysis had been recognized before 1945 and 33 cases from 1946 to 1996, mostly occurring in long-haired girls, when the tick had attached to the neck unnoticed. In those US cases where the arthropod could be identified, the hard tick *Dermacentor andersoni* was consistently responsible (Rose, 1954; Dworkin et al., 1999; Torres and Schlossberg, 2000; Vedanarayanan et al., 2002).

A specific neurotoxin has not yet been described from European ticks, but the following genera have been

associated with tick paralysis in Europe: *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, and *Boophilus* (Torres and Schlossberg, 2000). *Argas reflexus*, a pigeon tick, is known to produce IgE-mediated anaphylactic reactions in humans (Rolla et al., 2004).

Lyme borreliosis has recently been described as a cause of orbital myositis, presenting with headache and diplopia in a male (Carvounis et al., 2004). However, serology (ELISA and Western blot) was negative for *Borrelia burgdorferi* in our patient, and orbital muscles were normal in MR-imaging. After exclusion of space occupying or inflammatory brain lesions and common tick-borne infections, the probable cause of the promptly reversible neurological disorder in our patient is a tick toxin-mediated paralysis.

In Europe, tick bite paralysis has rarely been described and may be under-reported. However, with appropriate clinical presentation and lack of evidence for any other disease, this should be included in the differential diagnosis of post-tick bite neurological sequelae also in Europe.

References

- Carvounis, P.E., Mehta, A.P., Geist, C.E., 2004. Orbital myositis associated with *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease) infection. *Ophthalmology* 111, 1023–1028.
- Dworkin, M.S., Shoemaker, P.C., Anderson, D.E., 1999. Tick paralysis: 33 human cases in Washington State, 1946–1996. *Clin. Infect. Dis.* 29, 1435–1439.
- Grattan-Smith, P.J., Morris, J.G., Johnston, H.M., Yiannikas, C., Malik, R., Russel, R., Ouvrier, R.A., 1997. Clinical and neurophysiological features of tick paralysis. *Brain* 120, 1975–1987.
- Mans, B.J., Louw, A.I., Neitz, A.W., 2003. The major tick salivary gland proteins and toxins from the soft tick, *Ornithodoros savignyi*, are part of the tick lipocalin family: implications for the origins of tick toxicoses. *Mol. Biol. Evol.* 20, 1158–1167.
- Miller, M.K., 2002. Massive tick (*Ixodes holocyclus*) infestation with delayed facial-nerve palsy. *Med. J. Aust.* 176, 264–265.
- Rolla, G., Nebiolo, F., Marsico, P., Guida, G., Bigo, P., Riva, G., Zanotta, S., 2004. Allergy to pigeon tick (*Argas reflexus*): demonstration of specific IgE-binding components. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 135, 293–295.
- Rose, I., 1954. A review of tick paralysis. *Can. Med. Assoc. J.* 70, 175–176.
- Torres, J.M., Schlossberg, D., 2000. Tick paralysis. In: Cunha, B.A. (Ed.), *Tick-borne Infectious Diseases – Diagnosis and Management*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 103–110.
- Vedanarayanan, V., Evans, O.B., Subramony, S.H., 2002. Tick paralysis in children: electrophysiology and possibility of misdiagnosis. *Neurology* 59, 1088–1090.
- Vedanarayanan, V., Sorey, W.H., Subramony, S.H., 2004. Tick paralysis. *Semin. Neurol.* 24, 181–184.

1. Winkelmann A, Metze C, **Frimmel S**, Reisinger EC, Zettl UK, Loebermann M. Tick-borne encephalitis vaccination in multiple sclerosis: A prospective, multicenter study. **7,35**
2. **Frimmel S**, Schipper J, Hinz M, Bogdanow S, Mitzner SR, Koball S. Cytokine Adsorption is a promising tool for therapy of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH). *International Journal of Artificial Organs* 2019; 26:391398819857444. [Epub ahead of print] **1,23**
3. **Frimmel S**, Löbermann M, Feldhusen F, Seelmann M, Stiasny K, Süß J, Reisinger EC. Detection of tick-borne encephalitis virus antibodies in sera of sheep and goats in Mecklenburg-Western Pomerania (north-eastern Germany). *Ticks Tick Borne Dis.* 2019 Apr 14. pii: S1877-959X(19)30068-8. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.04.012. [Epub ahead of print] **3,06**
4. Kunze U; ISW-TBE. Report of the 20th annual meeting of the International Scientific Working Group on Tick-Borne Encephalitis (ISW-TBE): ISW-TBE: 20 years of commitment and still challenges ahead. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019 Jan;10(1):13-17. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.08.004. Epub 2018 Aug 7. **3,06**
5. Hemmer CJ, Emmerich P, Loebermann M, **Frimmel S**, Reisinger EC. [Mosquitoes and Ticks: The Influence of Global Warming in the Transmission of Infectious Diseases in Germany]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2018. Nov; 143(23):1714-1722. **0,64**
6. Kunze U; ISW-TBE. Report of the 19th Annual Meeting of the International Scientific Working Group on Tick-Borne Encephalitis (ISW-TBE) - TBE in a changing world. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018 Feb;9(2):146-150. **3,06**
7. Navarro D, San-Juan R, Manuel O et al. Cytomegalovirus infection management in solid organ transplant recipients across European centers in the time of molecular diagnostics: An ESGICH survey. *Transpl Infect Dis.* 2017 Dec; 19. doi: 10.1111. **2,11**
8. **Frimmel S**, Mitzner SR, Koball S. Immunoabsorption as a Long-Term Therapy in Recurrent Focal Segmental Glomerulosclerosis after Renal Transplantation. *Ther Apher Dial.* 2017. **1,08**
9. **Frimmel S**, Leister M, Löbermann M, Feldhusen F, Seelmann M, Süß J, Reisinger EC. Seroprevalence of tick-borne-encephalitis virus in wild game in Mecklenburg-Western Pomerania (north-eastern Germany). *Ticks Tick Borne Dis.* 2016; 7: 1151-1154. **3,06**
10. **Frimmel S**, Schipper J, Henschel J, Yu TT, Mitzner SR, Koball S. First description of single-pass albumin dialysis combined with cytokine adsorption in fulminant liver failure and hemophagocytic syndrome resulting from generalized herpes simplex virus 1 infection. *Liver Transpl.* 2014; 20: 1523-1524. **4,16**
11. Majcher-Peszynska J, Loebermann M, Klammt S, **Frimmel S**, Mundkowski RG, Welte T, Reisinger EC, Drewelow B; CAPNETZ Study Group. Ampicillin/sulbactam in elderly patients with community-acquired pneumonia. *Infection.* 2014; 42: 79-87. **2,93**
12. **Frimmel S**, Krienke A, Riebold D, Loebermann M, Littmann M, Fiedler K, Klaus C, Süß J, Reisinger EC. Tick-borne encephalitis virus habitats in North East Germany: reemergence of **2,20**

TBEV in ticks after 15 years of inactivity. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:3 08371.

13. Loebermann M, Voss U, Meyer S, Bosse D, Fritzsche C, Klammt S, **Frimmel S**, Riebold D, Reisinger EC. Clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of a trivalent surface antigen seasonal influenza vaccine produced in mammalian cell culture and administered to young and elderly adults with and without A(H1N1) pre-vaccination. *PLoS One.* 2013 Aug 16;8(8):e70866. **2,78**
14. Ziegler S, Ruhl M, Tenckhoff H, Wiese M, Heinemann FM, Horn PA, Spengler U, Neumann-Haefelin C, Nattermann J, Timm J; East-German HCV Study Group. Susceptibility to chronic hepatitis C virus infection is influenced by sequence differences in immunodominant CD8+ T cell epitopes. *J Hepatol.* 2013; 58: 24-30. **18,95**
15. Klein M, Heinemann FM, Tenckhoff H, Wiese M, Horn PA, Viazov S, Spengler U, Roggendorf M, Scherbaum N, Nattermann J, Hoffmann D, Timm J; East German HCV Study Group. CD8+ T-cell response promotes evolution of hepatitis C virus nonstructural proteins. *Gastroenterology.* 2011; 140: 2064-2073. **19,23**
16. Loebermann M, Anders G, Brestrich G, Fritzsche C, Klammt S, Boršo D, **Frimmel S**, Riebold D, Reisinger EC. Safety and immunogenicity of a trivalent single dose seasonal influenza vaccine containing pandemic A(H1N1) antigen in younger and elderly subjects: a phase III open-label single-arm study. *Vaccine.* 2011; 29: 1228-1234. **3,27**
17. Tillmann HL, Thompson AJ, Patel K, Wiese M, Tenckhoff H, Nischalke HD, Lokhnygina Y, Kullig U, Göbel U, Capka E, Wiegand J, Schiefke I, Güthoff W, Grüngreiff K, König I, Spengler U, McCarthy J, Shianna KV, Goldstein DB, McHutchison JG, Timm J, Nattermann J; German Anti-D Study Group. A polymorphism near IL28B is associated with spontaneous clearance of acute hepatitis C virus and jaundice. *Gastroenterology.* 2010; 139: 1586-1592. **19,23**
18. **Frimmel S**, Hemmer CJ, Kenzler J, Unverricht M, Ince H, Nienaber CA, Reisinger EC. Prevention of endothelial cell apoptosis induced by neutrophils and sera from patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2010 24; 144:151-154. **3,47**
19. **Frimmel S**, Krienke A, Riebold D, Löbermann M, Littmann M, Fiedler K, Klaus C, Süß J, Reisinger EC. [Tick-borne encephalitis virus in humans and ticks in Northeastern Germany]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2010; 135: 1393-1396. **0,64**
20. Hemmer CJ, **Frimmel S**, Kinzelbach R, Gürtler L, Reisinger EC. [Global warming: trailblazer for tropical infections in Germany?]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2007; 132: 2583-2589. **0,64**
21. **Frimmel S**, Löbermann M, Buxton B, Reisinger EC. Abducens nerve palsy following a tick bite: a case report. *Int J Med Microbiol.* 2006 May; 296 Suppl 40: 304-305. **3,36**

ORIGINALPUBLIKATIONEN OHNE IMPACT FACTOR

1. Ehrhardt S, Guo N, Hinz R, Schoppen S, May J, Reiser M et al. *Saccharomyces boulardii* to prevent antibiotic-associated diarrhea: A randomized, double-masked, placebo-controlled trial. *Open Forum Infectious Diseases*. 2016 Jan 1;3(1). ofw011. Available from, DOI: 10.1093/ofid/ofw011.
2. **Frimmel S**. Impfungen bei chronischer Nierenerkrankung, Dialyse und nach Nierentransplantation. *NephroNews* 2016; 18: 4-10. ISSN 1682-6817.
3. **Frimmel S**, Loebermann M, Reisinger EC. *Vibrio vulnificus* – ein tropischer Erreger in der Ostsee. *Aerzteblatt MV* 2011; 21: 253.
4. Hemmer CJ, **Frimmel S**, Reisinger EC. Klimawandel und „emerging infections“. *Universum Innere Medizin* 2013; 1: 34-36
5. **Frimmel S**. Virus in *Ixodes ricinus* nach 15 Jahren erneut isoliert FSME-Virus bei Menschen und Zecken in M/V. *MedReview* 2011; 7: 22-23
6. **Frimmel S**, Hemmer CJ, Löbermann M, Reisinger EC. [Climate change and global warming. Towards the global spread of tropical infectious diseases? *Climate Change and Global Warming*]. *Pharm Unserer Zeit*. 2009; 38: 492-499.

KONGRESSBEITRÄGE, POSTER, ABSTRACTS (Auswahl)

1. Koball S, Heskamp B, Körtge A, **Frimmel S**, Hinz M, Mitzner S. In Vitro Cytokine Removal: Comparison of Conventional High-Flux Dialyzers and Middle-Cut-Off Dialyzer (Theranova HDx). FR-PO465, American Society of Nephrology, Kidney Week 2019, Washington 11/2019.
2. **Frimmel S**, Tsui TY, Schipper J, Hinz M, Führer A, Kiefel V, Mitzner SR, Koball S. First Description of successful ABO-incompatible living donor liver transplantation including unspecific Ig-Immunoabsorption. 20th ISAD Warnemünde 2019.
3. **Frimmel S**, Hinz M, Mitzner S, Sebastian Koball. Hemodialysis in adults without anticoagulation. ERA-EDTA 2018 Copenhagen, SP469, NDT 2018.
4. Koball S, **Frimmel S**, Hinz M, Mitzner S, Middle Cut off (MCO) Dialyzers in patients with multiple myeloma- removal of light chains with HDX-therapy. ERA-EDTA Copenhagen 2018, SP486, NDT 2018.
5. Koball S, Westphal C, **Frimmel S**, Hinz M, Klammt S, Mitzner S, Comparison of Albumin Binding Capacity and Uremic Toxins in Hemodiafiltration versus Novel Dialysis Membrane. Congress of the American Society of Nephrology, New Orleans 2017.
6. S. Koball, M. Hinz, **S. Frimmel**, S. Mitzner. Heparin-freie Dialyse im Klinikalltag. Kongress für Nephrologie Mannheim 2017. 9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie; P 140.
7. **Frimmel S**, Schipper J, Bogdanow, Mitzner, Koball. Cytokine Adsorption is a promising tool for therapy of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH). ERA-EDTA Madrid 2017, NDT 2017.
8. **S. Frimmel**, A. Führer, R. Oerter, S. Schwarzenböck, S. Mitzner. Renale Beteiligung bei Sarkoidose und Einzelniere-ein diagnostisches Problem. Kongress für Nephrologie Berlin 2016, 8. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie; P84.
9. Führer, **S. Frimmel**, S. Mitzner. Warum wir neue anti-CMV wirksame Medikamente brauchen. Erläuterungen anhand einer Kasuistik. Kongress für Nephrologie Berlin 2016, 8. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie P 128.
10. **Frimmel** et al. First description of single-pass albumin dialysis combined with cytokine adsorption in fulminant liver failure and hemophagocytic syndrome resulting from generalized herpes simplex virus 1 infection. ISAD Warnemünde 2014.
11. **S. Frimmel**, S. Mitzner, M. Hinz, A. Führer, S. Koball Immunadsorption als Therapiekonzept bei rekurrender fokal-segmentaler Glomerulosklerose nach Nierentransplantation

Kongress für Nephrologie Berlin 2014, 6. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie P 220

12. M. Löbermann, C. Fritzsche, I. Hilgendorf, **S. Frimmel**, E.C. Reisinger. Langsames Ansprechen auf Entecavir unter immunsuppressiver Therapie bei chronischer Hepatitis B. P63 KIT 2012 Köln.
13. M Loebermann , D Riebold, C Fritzsche, **S Frimmel**, H Nizze, EC Reisinger. Successful treatment of disseminated cutaneous Leishmania major infection with miltefosine. Poster 17. Biannual Meeting of the German Society of Tropical Medicine and International Health, Munich 6-7 Nov. 2009.
14. **S. Frimmel**, A. Krienke, D. Riebold, M. Löbermann, M. Littmann, K. Fiedler, C. Klaus, J. Süß, E. C. Reisinger. Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)-Virus bei Menschen und Zecken in Mecklenburg-Vorpommern. 117. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden 2011. P159.
15. C.E. Brunnemann, G. Schröder, K. Zimmermann, S. Klammt, **S. Frimmel**, B. Panzig (Rostock, Greifswald, Germany). Prevalence of Borrelia burgdorferi sensu lato in Ixodes ricinus ticks in eastern West Pomerania (Germany), P46, X International Jena Symposium on Tick-borne Diseases, Weimar 2009.
16. **Frimmel** et al. Brain abscess, a clinical survey of the last two decades. KIT 2004, Posterpreis.
17. **Frimmel** et al. Tick paralysis as a cause of abducens nerve palsy. International Jena Symposium on Tick-borne Diseases, Jena 2004.

VORTRÄGE (AUSWAHL)

„**Spezielle Aufgaben I und II**“, 4 UE Prüfartzkurs; Aufbaukurs für Leiter und Stellvertreter von Klinischen Prüfungen nach AMG. KKS Universität Rostock 14.09.2019.

Der besondere Fall, 54. Jahrestagung der Gesellschaft der Internisten Mecklenburg-Vorpommerns e.V. 10.05.2019

Detection of tick-borne encephalitis virus antibodies in sera of sheep and goats in Mecklenburg-Western Pomerania (north-eastern Germany). O7. XIII International Symposium on Ticks and Tick-borne Diseases Weimar 28.03.2019.

ZVK-assoziierte Infektionen – Fachvortrag/Problem- und Lehrvisite Zentrum für Innere Medizin 08.11.2018.

„**Spezielle Aufgaben I und II**“, 4 UE Prüfarztkurs; Aufbaukurs für Leiter und Stellvertreter von Klinischen Prüfungen nach AMG. KKS Universität Rostock 15.09.2018.

Katheter-assoziierte Infektionen und Staphylococcus-aureus-Bakteriämie. Antibiotic Stewardship Grundkurs der Ärztekammer Mecklenburg-Vorpommern. 04.09.2018.

„**Spezielle Aufgaben I und II**“, 4 UE Prüfarztkurs Aufbaukurs für Leiter und Stellvertreter von Klinischen Prüfungen nach AMG. KKS Universität Rostock 30.09.2017.

Impfungen bei chronischer Nierenerkrankung, Dialyse und nach Nierentransplantation, Fischland Symposium Dierhagen; Nephrologisches Diskussionsforum 2016.

Kombinierte CytoSorb® und SPAD Behandlung bei Patienten mit fulminantem Leberversagen und hämophagozytotischem Syndrom. 2. CytoSorb Anwendertreffen 2. Dezember 2014, Hamburg.

Rekurrierende FSGS, Rostocker Nierenseminar 2014.

Hyponatriämie, Rostocker Nierenseminar 2012.

Tick-borne encephalitis in ticks in north-eastern Germany-first detection after 15 years. V43, X International Jena Symposium on Tick-borne Diseases, Weimar 2009.

Tick paralysis; Jahrestagung der Gesellschaft der Internisten Mecklenburg / Vorpommerns e. V., Vortragspreis bester Kurzvortrag 2005.

Regelmäßig **Fallvorstellungen und Fachvorträge** im Rahmen der „Lehr- und Problemvisiten“ des Zentrums für Innere Medizin, UMR.

PEER REVIEWS (AUSWAHL):

International Journal of Artificial Organs (IF 1.13)

Emerging Microbes and Infection (IF 6.03)

Therapeutic Apheresis and Dialysis (IF 1.48)

Infection, Genetics and Evolution, Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases (MEEGID) (IF 2.55)

LERHRTÄTIGKEIT

Seminar für PJ Studenten Thema: Akutes Nierenversagen Koordinator: PD Dr. M. Lommatzsch	11./12. Semester
Vorlesung Innere Medizin für Zahnmediziner Themen: Infektiologie, Nephrologie, Rheumatologie Verantwortlich: Dr. A. Knauerhase	6.und 7. Semester
Praktikum Klinische Propädeutik u. Untersuchungstechniken Unterricht am Krankenbett Koordinator: PD Dr. M. Lommatzsch	5. Semester
Fachbegeleitendes Seminar Innere Medizin Fälle Nephrologie Verantwortlich Prof. S. Mitzner	7. Semester
Blockpraktikum Innere Medizin Seminar Verantwortlich PD. Dr. med. habil C. Fritzsche	9. Semester
Blockpraktikum Innere Medizin Unterricht am Krankenbett Verantwortlich PD. Dr. med. habil C. Fritzsche	

Prüfer:

Staatsexamen Zahnmedizin (Innere Medizin)

TEILNAHME AN KURSEN ZUR HOCHSCHULDIDAKTISCHEN WEITERBILDUNG

Tag der Lehre 2016 (Workshop: Abgleich unseres klinisch praktischen Lernzielkatalogs mit dem NKLM)

Workshop Hochschuldidaktik (Universität Rostock) „Eine starke Stimme für die Lehre“ 20.Okt. 2017

Tag der Lehre 2017 (Workshop: Interprofessionelle Kommunikation)

LEBENS LAUF

Name:	Silvius Dietrich Gustav Frimmel, Dr. med. univ.
Anschrift	Blücherstraße 55D, 18055 Rostock
Telefon:	0176 23258696
E-Mail:	silvius.frimmel@med.uni-rostock.de
Geburtstag, -ort	03.08.1977, Wien (Österreich)
Gegenwärtige Position	Facharzt, Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten, Sektion Nephrologie, Zentrum für Innere Medizin 2, Universitätsmedizin Rostock
Qualifikationen	Facharzt für Innere Medizin Facharzt für Innere Medizin und Nephrologie
Schulische Ausbildung	
1981 - 1985	Neuland-Schule, Wien, Österreich
1985 – 1992	Schottengymnasium Wien, Österreich
Studium der Humanmedizin	
1995 - 2004	Universität Wien, Österreich
Doktorarbeit	
2003 - 2004	Management and outcome of bacterial brain abscess in one hundred patients during the last two decades. Betreuer Univ. Prof. Dr. med univ. Karl Rössler (Medizinische Universität Wien)
Berufliche Tätigkeit	
04/04 – 10/2004	Arzt im Praktikum, Abteilung für Tropenmedizin und Infektiologie, Universitätsmedizin Rostock
10/04 - 11/2011	Assistenzarzt, Abteilung für Tropenmedizin und Infektiologie Universitätsmedizin Rostock
11/11 – 09/2015	Facharzt für Innere Medizin, Abteilung für Tropenmedizin und Infektiologie, Universitätsmedizin Rostock
Seit 09/2011	Facharzt für Innere Medizin und Nephrologie, Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten, Sektion Nephrologie, Zentrum für Innere Medizin 2, Universitätsmedizin Rostock
04-06/2010	Diplomkurs Tropenmedizin, Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg
2017-2018	Fortbildung Antibiotic-Stewardship: Module I-IV