

Amtliche Methodensammlung

Durch Zecken übertragene Krankheiten - Frühsommer- Meningoenzephalitis

- 1. Charakterisierung der Infektion**
- 2. Untersuchungsmaterial**
- 3. Untersuchungsgang**

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Das Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)-Virus ist ein kleines, umhülltes Plusstrang-RNA-Virus und steht taxonomisch im Genus *Flavivirus* der Familie *Flaviviridae*. Es ist ein neurotropes Virus, welches durch molekularbiologische Daten in drei Subtypen, den zentraleuropäischen, fernöstlichen und sibirischen, unterteilt werden konnte. Die Sequenzunterschiede zwischen diesen Subtypen sind nur gering.

Die wichtigsten kompetenten Vektoren des FSME-Virus (FSMEV) und zugleich Reservoirs sind Schildzecken, in Zentraleuropa *Ixodes ricinus*, der Gemeine Holzbock, und in Fernost und Sibirien *Ixodes persulcatus*, die Taigazecke. Zwischen diesen Zecken und den wichtigsten Reservoirwirten, vor allem Kleinsäugetern und Insektivoren, aber auch Großwild, zirkuliert das FSMEV in sog. Naturherden dieser viralen Zoonose. Der Mensch spielt ökologisch keine Rolle und ist ein Fehlwirt. Die Risikogebiete sind über Jahre stabil, können sich aber auch verändern. Das FSMEV wird hauptsächlich durch den Zeckenstich übertragen, doch spielt in Ost- und Südosteuropa sowie dem Baltikum die alimentäre FSME durch Infektion mit virushaltiger Rohmilch (vor allem von Ziegen und Schafen, seltener von Rindern) eine gewisse Rolle. In Deutschland und dem übrigen Mittel- bzw. Westeuropa ist dieser Übertragungsweg nur von marginaler Bedeutung, allerdings wurden gerade in den letzten Jahren auch aus Deutschland wieder einzelne humane Fälle alimentärer FSME (aus Bayern und Baden-Württemberg) berichtet, die zuletzt in den 60er Jahren in Sachsen aufgetreten waren.

1.2 Klinische Symptomatik

Die FSME ist die bedeutendste durch Zecken übertragene humane Viruserkrankung Europas und eine klassische virale Zoonose. Die FSME kommt in Europa in fast allen Ländern (außer im Vereinigten Königreich, und auf der Iberischen Halbinsel) und in den Beneluxstaaten autochthon vor, wobei die Inzidenz in den einzelnen Risikogebieten-Ländern extrem differieren kann. Bei vermutlich hoher Dunkelziffer werden in Europa einschließlich Russland jährlich ca. 10.000 FSME-Erkrankungen registriert, jedoch auch mit erheblichen jährlichen Schwankungen. Außerhalb Europas ist das FSMEV in Japan, Nordchina, der Mongolei, in Kasachstan, Kirgisien und Korea endemisch. In Deutschland sind FSME-Erkrankungen beim Menschen meldepflichtig.

Im Bereich der Veterinärmedizin ist die klinische FSME beim Hund seit mehr als 30 Jahren bekannt und in den meisten Endemiegebieten der FSME beobachtet worden, so auch in Deutschland. Saisonale Häufungen und Erkrankungen nach Zeckenstichexposition sind anamnestisch für die Diagnostik von Bedeutung. Insgesamt ist die FSME beim Hund jedoch eine eher seltene Erkrankung. Die klinischen Symptome sind sehr unterschiedlich, die Erkrankung kann subklinisch bis perakut-letal verlaufen. Neben Fieber können gleichzeitig neurologische Symptome auftreten. Selten wird eine FSME des Pferdes beschrieben, es werden jedoch z. T. hohe Antikörpertiter gebildet, die differentialdiagnostisch bei der Bestimmung von West-Nil-Virus (WNV)-Antikörpertitern eine Rolle spielen und dort zu falsch positiven Ergebnissen führen können

Durch Zecken übertragene Krankheiten - Frühsommer-Meningoenzephalitis

(Ziegler *et al.*, 2013, Klaus *et al.*, 2014). Schafe, Ziegen und Rinder bilden nach einer Infektion mit FSMEV ebenfalls Antikörpertiter aus; ein klinisches Bild ist extrem selten und wurde bisher nur bei einer Ziege und einem Mufflon beobachtet. Diese Tierarten können über die Bestimmung der FSMEV-Antikörper als Sentinels zur epidemiologischen Beschreibung eines FSME-Naturherdes herangezogen werden. Einen Überblick zur klinischen und epidemiologischen Bedeutung der FSME bei Tieren sowie zur differentialdiagnostischen Abgrenzung geben Klaus *et al.* (2016a). **Eine Melde- oder Anzeigepflicht für FSME bei Tieren besteht nicht.** Auch bei Vögeln wurden in Einzelfällen FSMEV oder FSMEV-Antikörpertiter nachgewiesen, wodurch prinzipiell eine Beteiligung von Vogelspezies an der Verbreitung der FSMEV in bisher FSMEV-freie Gebiete vorstellbar ist (u. a. Waldenström *et al.*, 2007; Klaus *et al.*, 2016b).

1.3 Differentialdiagnose

Im Frühstadium ist an alle Influenza-ähnlichen Infektionen, später ist an andere, auch bakterielle Meningitiden und Enzephalitiden zu denken.

1.4 Diagnostische Indikation

Klinischer oder epidemiologisch begründeter Verdacht.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Robert-Koch-Institut, das beauftragte Konsiliarlabor für FSME, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr (IMB) Neuherbergstr. 11, 80937 München Ansprechpartner: PD Dr. Gerhard Dobler, Tel. 089 9926 9239-74; Fax: 089 9926 9239 - 83, gerharddobler@bundesewehr.org
- Friedrich-Loeffler-Institut, Nationales Referenzlabor für durch Zecken übertragene Krankheiten, Naumburger Straße 96a, 07743 Jena, Tel. 03641 804 2231
- Staatliche Veterinäruntersuchungseinrichtungen und private, akkreditierte Labore mit entsprechender Expertise

1.6 Rechtsgrundlagen

- Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Erfassung, Auswertung und Veröffentlichung von Daten über das Auftreten von Zoonosen und Zoonoseerregern entlang der Lebensmittelkette (AVV Zoonosen Lebensmittelkette) in der aktuell gültigen Fassung;
- Verordnung mit lebensmittelrechtlichen Vorschriften zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern (ZoonoseV) in der aktuell gültigen Fassung;
- Richtlinie 2003/99/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17. November 2003 zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern und zur Änderung der Entscheidung 90/424/EWG des Rates sowie zur Aufhebung der Richtlinie 92/117/EWG des Rates, in der aktuell gültigen Fassung.

2. Untersuchungsmaterial

Untersuchungsmaterial für den Erregernachweis

Blut (Serum), Liquor cerebrospinalis (LCS) für den Virusnachweis sowie *post mortem* bei enzephalitischen Verläufen besonders Hirngewebe, aber auch andere Organe.

Nachweis in Zecken zur Bewertung der lokalen epidemiologischen Situation.

Untersuchungsmaterial für den Antikörpernachweis

Blut (Serum), Liquor cerebrospinalis (LCS) für den Antikörpernachweis.

Beförderung der Proben

Materialien für den Virusnachweis nach Absprache mit dem Labor gekühlt und per Kurier einsenden. Wenn der Transport länger dauert, unbedingt bei -70 °C lagern. Blut sollte heparinisiert werden, Materialien für den indirekten Nachweis (AK) gekühlt versenden. Für die Serologie ist der Versand von Serum besser geeignet als der von Blut.

3. Untersuchungsgang

3.1 Erregernachweis

Virusnachweis

Der Virusnachweis erfolgt üblicherweise durch quantitative realtime-RT-PCR, aber auch eine Anzucht in der Zellkultur oder elektronenmikroskopische Nachweisverfahren sind möglich. Meist wird an eine FSME erst gedacht, wenn die klinische Symptomatik entsprechend ausgeprägt ist. Zu diesem Zeitpunkt sind die FSMEV bereits aus dem Blut verschwunden, weshalb sehr selten ein Virusnachweis erfolgreich ist. Die Methoden des direkten Virusnachweises sind besonders für die *post mortem*-Diagnostik und den ggf. aus epidemiologischen Gründen erwünschten Virusnachweis in Zecken geeignet.

Die Virusanzucht und -typisierung ist Speziallabors vorbehalten und hat in einem Sicherheitslabor der Stufe S3 zu geschehen.

Virusanzuchtversuche können z. B. mittels BHK21-Zellen, primären Hühnerembryofibroblasten, HeLa- und Vero-Zellen und einer Nierenepithelzelle vom erwachsenen Rhesusaffen (Lc-MK2) unternommen werden. Ein Problem besteht darin, dass in Zellkulturen meist kein CPE erkennbar ist. Zur Identifizierung des Virus aus der Kultur kann eine Untersuchung mittels quantitativer realtime RT-PCR oder ein direkter IFA durchgeführt werden.

Eine Virustypisierung, insbesondere die Einordnung in die drei bekannten Virussubtypen, kann im Speziallabor mittels Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz-Analyse erfolgen, insbesondere deshalb, weil die Sequenzhomologien zwischen den Virussubtypen groß sind und die Zahl verwandter Flaviviren ebenfalls.

Durch Zecken übertragene Krankheiten - Frühsommer-Meningoenzephalitis

Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Proben werden mit kommerziell erhältlichen Testkits aufgearbeitet und die RNA isoliert. Bei Zecken ist vor der Isolierung der RNA die gründliche Homogenisierung wichtig für den Untersuchungserfolg (z. B. mit einer Kugelmühle).

Da das FSMEV-Genom als Einzelstrang-RNA vorliegt, wird eine quantitative realtime RT-PCR durchgeführt (Schwaiger and Cassinotti, 2003; Klaus *et al.*, 2010a; 2010b). Die Sequenzierung der positiven Proben ist im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen sinnvoll.

Spezielle diagnostische Fragestellungen

In besonderen Fällen kann es nützlich sein, den Virusnachweis in ungesogenen *Ixodes ricinus* für epidemiologische Untersuchungen oder zur Naturherd- bzw. Risikogebietscharakterisierung zu führen, wobei zur Bewertung auf ausreichend große Stichproben aus dem zu beurteilenden Gebiet zu achten ist, denn sogar in Risikogebieten liegen die zu erwartenden Prävalenzen in Zecken nur im einstelligen Prozentbereich. Der Virusnachweis in einer einzelnen gesogenen Zecke zur Risikoeinschätzung bringt in der Regel keine Klarheit, da er von begrenzter Aussage und therapeutisch ohnehin irrelevant ist.

3.2 Antikörpernachweis

Die Methode der Wahl ist wie in der Humanmedizin ein ELISA für den FSMEV-AK-Nachweis. Es gibt wenige kommerziell erhältliche "all species"-Testkits zur Anwendung in der Veterinärmedizin, die mittlerweile jedoch gut validiert sind (Klaus *et al.*, 2011; 2012; 2014). Das Konjugat bei diesen Kits basiert häufig auf Protein G, um einen "all species"-Einsatz zu ermöglichen. Dadurch variieren die Ergebnisse von Tierart zu Tierart bezüglich Spezifität. Deshalb sollte insbesondere bei Wiederkäuern der Serum-Neutralisationstest immer zur Bestätigung der im ELISA positiven Seren durchgeführt werden. Auch der Cut-Off im ELISA unterscheidet sich von Tierart zu Tierart und sollte zunächst mittels negativer Seren bestimmt werden, sofern für den verwendeten Kit keine entsprechenden Untersuchungen vorliegen.

4. Literatur

- Hubálek Z, Rudolf I (2012). Tick-borne viruses in Europe. *Parasitol. Res.* 2012;111:9-36.
- Klaus C, Hoffmann B, Hering U, Mielke B, Sachse K, Beer M, Süß J (2010a). Tick-borne encephalitis (TBE) virus prevalence and virus genome characterization in field-collected ticks (*Ixodes ricinus*) in risk, non-risk, and former risk areas of TBE, and in ticks removed from humans in Germany. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:238-244.
- Klaus C, Hoffmann B, Beer M, Müller W, Stark B, Bader W, Stiasny K, Heinz FX, Süß J (2010b). 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 Tickborne Dis* 2010;1:141-144.

Durch Zecken übertragene Krankheiten - Frühsommer-Meningoenzephalitis

- 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. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 2011;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 Tickborne Dis* 2012;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.* 2014; 10:78
- Klaus C, Hoffmann D, Hoffmann B, Beer M (2016a). Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus-Infektionen bei Tieren - Klinik, Diagnostik und epidemiologische Bedeutung. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 2016;130:102-112.
- Klaus C, Gethmann J, Hoffmann B, Ziegler U, Heller M, Beer M (2016b). Tick infestation in birds and prevalence of pathogens in ticks collected from different places in Germany. *Parasitology Research* 2016;115:2729-2740.
- Mansfield KL, Horton DL, Johnson N, Li L, Barrett ADT, Smith DJ, Galbraith SE, Solomon T, Fooks AR (2011). Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. *J Clin Virol* 2011;92:2821-2829.
- Pierson TC, Diamond MS (2013). Flaviviruses. In: Knipe EM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Racaniello VR, Roizman B (ed's). *Fields Virology, Sixth Edition, 2013, Vol. 1, Chapter 26, 747-794.*
- Schwaiger M, Cassinotti P (2003). Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J Clin Virol* 2003; 27:136-145.
- Waldenström J, Lundkvist A, Falk KI, Garpmo U, Bergström S, Lindegren G, Sjöstedt A, Mejlom H, Fransson T, Haemig PD, Olsen B (2007) Migrating birds and tickborne encephalitis virus. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:1215-1218.
- Ziegler U, Angenvoort J, Klaus C, Nagel-Kohl U, Sauerwald C, Thalheim S, Horner S, Braun B, Kenklies S, Tyczka J, Keller M, Groschup MH (2013). Use of competition ELISA for West Nile Virus monitoring of horses in Germany. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2013; 10, 3112-3120

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Südufer 10, D-17493 Greifswald - Insel Riems, www.fli.de