

Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis viruses in Switzerland

Graduate School for Cellular and Biomedical Sciences
University of Bern
PhD Thesis

Submitted by
Rahel Gäumann
from Häutligen BE

Thesis advisor

Prof. Dr. med. Dr. phil. nat. Kathrin Mühlemann
Institute for Infectious Diseases
Medical Faculty of the University of Bern

Accepted by the Faculty of Medicine, the Faculty of Science and the
Vetsuisse Faculty of the University of Bern at the request of the
Graduate School for Cellular and Biomedical Sciences

Bern, Dean of the Faculty of Medicine

Bern, Dean of the Faculty of Science

Bern, Dean of the Vetsuisse Faculty Bern

To my family

1 SUMMARY	3
2 ACKNOWLEDGEMENTS	5
3 ABBREVIATIONS	6
4 INTRODUCTION	9
4.1 Virology	9
4.1.1 Virus classification	9
4.1.2 Virus morphology and genome structure	9
4.1.3 Virus replication cycle	13
4.1.4 Molecular determinants of virulence	14
4.2 Ecology	16
4.2.1 Biology and life cycle of the virus vector <i>Ixodes ricinus</i>	16
4.2.2 Circulation of TBEV in the ecosystem	18
4.2.3 Microevolution of TBEV	20
4.3 Epidemiology	21
4.3.1 Geographical distribution and molecular phylogenetics	22
4.3.2 Disease incidence	24
4.3.3 Disease surveillance	26
4.4 Description of the disease	27
4.4.1 Routes of infection	28
4.4.2 Pathogenesis	28
4.4.3 Host immune response	31
4.4.4 Clinical manifestations	33
4.4.5 Diagnosis, treatment, and prevention	35

5 AIMS OF THE THESIS	38
6 RESULTS	39
6.1 High-Throughput Procedure for Tick Surveys of Tick-Borne Encephalitis Virus and Its Application in a National Surveillance Study in Switzerland	40
6.2 Phylogenetic and Virulence Analysis of Tick-Borne Encephalitis Virus Field Isolates from Switzerland	50
7 DISCUSSION AND OUTLOOK	75
8 REFERENCES	78
9 APPENDIX	91
10 DECLARATION OF ORIGINALITY	138

1 SUMMARY

Tick-borne encephalitis (TBE) is a zoonotic arbovirus infection of the central nervous system. The disease is caused by the tick-borne encephalitis virus (TBEV), which is endemic in an area ranging from western Europe to China and Japan. Within endemic foci, the virus is maintained in cycles involving *ixodid* ticks and wild vertebrate animals. During the last 30 years, the incidence of TBE has increased significantly. In Switzerland, about 110 to 120 annual human disease cases are presently reported. However, only very limited information on the endemicity of TBEV has been available so far. This thesis focused on the molecular epidemiology of TBEV in our country. Using a self-developed PCR-based test we performed a national tick surveillance study, the results of which significantly contribute to an improved risk assessment of TBE in Switzerland. Furthermore, the circulating viruses were characterized with respect to their basic biological and genetic properties.

For the purpose of large-scale surveillance studies, we developed a protocol involving an automated, high-throughput nucleic acid (NA) extraction method (QIAasymphony SP system) and a one-step duplex real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) for the detection of TBEV in ticks, including an internal process control. Establishment of the automated NA extraction procedure included optimization of a standard protocol and its evaluation against a modified guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction protocol. High usability, reproducibility, and equivalent performance for virus concentrations down to 5×10^3 viral genome equivalents/ μ l favor the automated protocol compared to the precipitation procedure. The validated real-time RT-PCR allows fast, sensitive (limit of detection: 10 RNA copies/ μ l), and specific (no false-positive test results for other TBEV subtypes, other flaviviruses, or other tick-transmitted pathogens) detection of European subtype TBEV. The established analytical system permits an extensive characterization of the true virus prevalence in natural TBE reservoirs and should be implemented in national surveillance systems in any European country where TBE is endemic.

We applied the new molecular test procedure in a national tick surveillance study, in which 62,343 ticks were collected at 165 collection sites throughout Switzerland by flagging low vegetation. Thirty-eight endemic foci could be identified, with a mean virus prevalence of 0.46 %. The foci do not fully agree with those defined by geographic mapping of clinical cases. Therefore, our data are a unique

complement of human disease case mapping and significantly improve risk assessment of TBE in Switzerland.

Sixty-four of 72 TBE viruses detected by real-time RT-PCR could successfully be recovered using porcine kidney stable or *Ixodes ricinus* tick cell culture systems. These isolates were characterized *in vitro* with respect to their plaque phenotype, since this has been associated with virulence. Two thirds (67 %) of isolates produced a mixture of plaques of different sizes, reflecting a heterogeneous population of virus variants. Isolates consistently forming plaques of small size, indicating low virulence, were associated with recently detected endemic foci with no or only sporadic reports of clinical cases. All of six virus isolates investigated in an *in vivo* mouse model were highly neurovirulent (100% mortality) but exhibited a relatively low level of neuroinvasiveness, with mouse survival rates ranging from 50 to 100 %. Thus, both *in vitro* and *in vivo* surrogates of virulence suggest a high proportion of isolates with relatively low neuropathogenic potential, which is in agreement with a hypothesized high proportion of subclinical or mild TBE cases.

The envelope (E) gene sequences and phylogenetic classification of all 72 TBE viruses were analyzed. Although the E protein is an important determinant of TBEV virulence, we could not clearly correlate any individual substitutions in this protein with attenuation of virus virulence, suggesting the presence of additional determinants of virulence in other genome regions. Phylogenetically, all isolates belonged to the European subtype and were highly related (mean pairwise sequence identity of 97.8 % at the nucleotide and 99.6 % at the amino acid level of the E protein). Isolates from four cantons formed clearly separated lineages, indicating a high degree of isolation of the respective foci.

Future research focusing on whole genome sequence analyses will permit more profound phylogenetic classification of Swiss TBEV. Besides, these studies will allow for the identification of additional mutations possibly affecting the pathogenic potential of TBE viruses. The biological significance of these substitutions will require confirmation by cDNA clone studies. Finally, characterization of viruses isolated from human TBE patients will provide important information on the clinical relevance of the different viruses circulating among the tick population.

2 ACKNOWLEDGEMENTS

Here I would like to thank all those people who accompanied and supported me throughout the three years of my PhD thesis.

I am very grateful to my thesis advisor Prof. Kathrin Mühlemann for her great support during my PhD time and for her investment of time into a project actually being outside of her field of research. I appreciated all the helpful discussions, the revision of my reports, abstracts, posters, and manuscripts, and, most of all, her trust in my autonomous work.

I particularly thank Dr. Christian Beuret for supervising my work at the SPIEZ LABORATORY, for introducing me into the principles and methods of molecular biology, for revising my scriptures, for his contributions of time and ideas, and for his helpful advice.

I am thankful to Dr. Martin Schütz and Dr. Marc Strasser for permitting the realization of this research project at the SPIEZ LABORATORY.

Special thanks go to Dr. Daniel Růžek for all his work on virus virulence, for his constant support and for sharing his knowledge on TBEV with me.

I thank Dr. Lise Gern for accepting to be my co-referee and for all her valuable advice and discussions on the epidemiology of TBEV and the biology of ticks.

Many thanks go to Dr. Olivier Engler for his guidance in viral culture systems and for the numerous inspiring conversations. I also highly appreciated the consultations by Dr. Matthias Wittwer about statistical evaluation of my data.

I am thankful to Dr. Nadia Schürch, Jasmine Portmann, Johanna Signer, Sandra Paniga, Marcelle Holzer, Fritz Wüthrich, Björn Hagmann, and Grégoire Dewarrat for their helpful support and all the friendly, enjoyable moments in the lab.

I would also like to thank all the people who participated in tick collection activities. It was only with their support that a study of this dimension was realizable.

My best thanks are reserved to my family and friends for their constant support, encouragement, patience, and understanding.

3 ABBREVIATIONS

aa	amino acid
ANOVA	analysis of variance
BBB	blood brain barrier
BHQ	Black Hole Quencher ®
BSA	bovine serum albumin
C protein	capsid protein
CCL2	CC chemokine ligand 2, also known as monocyte chemotactic protein-1
CCL5	CC chemokine ligand 5, also known as RANTES
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CEE	central European encephalitis
CL	level of confidence
CNS	central nervous system
Cq	quantification cycle
CSF	cerebrospinal fluid
CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10, also known as interferon-inducible protein-10
DDPS	Federal Department of Defense, Civil Protection and Sports
DNA	deoxyribonucleic acid
D-PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline without Ca ²⁺ and Mg ²⁺
E protein	envelope protein

EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	endoplasmatic reticulum
EU	European Union
FAM	6-carboxy-fluorescein
FITC	fluorescein isothiocyanate
FOPC	Federal Office for Civil Protection
FOPH	Federal Office for Public Health
i.c.	intracranial
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
IPC	internal process control
JOE	2',7'-dimethoxy-4',5'-dichloro-6-carboxyfluorescein
LOD	limit of detection
M protein	membrane protein
NA	nucleic acid
NS protein	non-structural protein
NT	neutralization test
ORF	open reading frame
p.i.	post infection
PBS	phosphate buffered saline

PCR	polymerase chain reaction
PFU	plaque forming units
prM	precursor of membrane protein
PS	porcine kidney stable
RNA	ribonucleic acid
RSSE	Russian spring summer encephalitis
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
s.c.	subcutaneous
sPECAM	soluble platelet adhesion molecule
TBE	tick-borne encephalitis
TBEV	tick-borne encephalitis virus
TNF	tumor necrosis factor
UTR	untranslated region
vMC ₀	avirulent-phenotype mutant strain of infectious mengovirus (<i>Cardiovirus</i> , <i>Picornaviridae</i>)

4 INTRODUCTION

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is the etiological agent of tick-borne encephalitis (TBE), a zoonotic arbovirus infection and serious cause of central nervous system (CNS) disease in humans [1]. In endemic areas, the pathogen is maintained in cycles involving *ixodid* ticks and wild vertebrate animals [1-2]. Throughout Europe, TBE constitutes an important health issue with an increasing morbidity and endemicity [2-4].

This introduction describes the main molecular biological properties of TBEV, its ecology and epidemiology, and the pathogenesis and clinical manifestations of the disease.

4.1 Virology

Since its first isolation in Europe in 1948 [5-6], several decades of research yielded considerable knowledge on the characteristics of TBEV. Here the molecular biological properties of the virus, its replication strategy, and important determinants of virus virulence are summarized.

4.1.1 Virus classification

According to the latest taxonomic scheme, TBEV is a member of the mammalian tick-borne flavivirus group, previously named TBEV serocomplex [7], which belongs to the genus *Flavivirus* within the *Flaviviridae* family [8]. The TBEV species includes three genetic lineages, or subtypes: European (previously central European encephalitis, CEE), Siberian (previously western Siberian), and Far Eastern (previously Russian spring summer encephalitis, RSSE) [9].

A recently proposed taxonomic improvement assigns TBEV and the genetically very closely related Louping ill virus to one species, including four types: western, eastern, Turkish sheep, and Louping ill [10].

4.1.2 Virus morphology and genome structure

Mature TBEV virions are spherical particles with a diameter of 50 to 60 nm [11]. They are composed of an icosahedral nucleocapsid consisting of a single stranded positive sense RNA genome enclosed by multiple copies of viral capsid (C)

protein, which is surrounded by a host cell-derived lipid bilayer containing two viral proteins, envelope (E) and membrane (M) (Figure 1a, b). The genome has a length

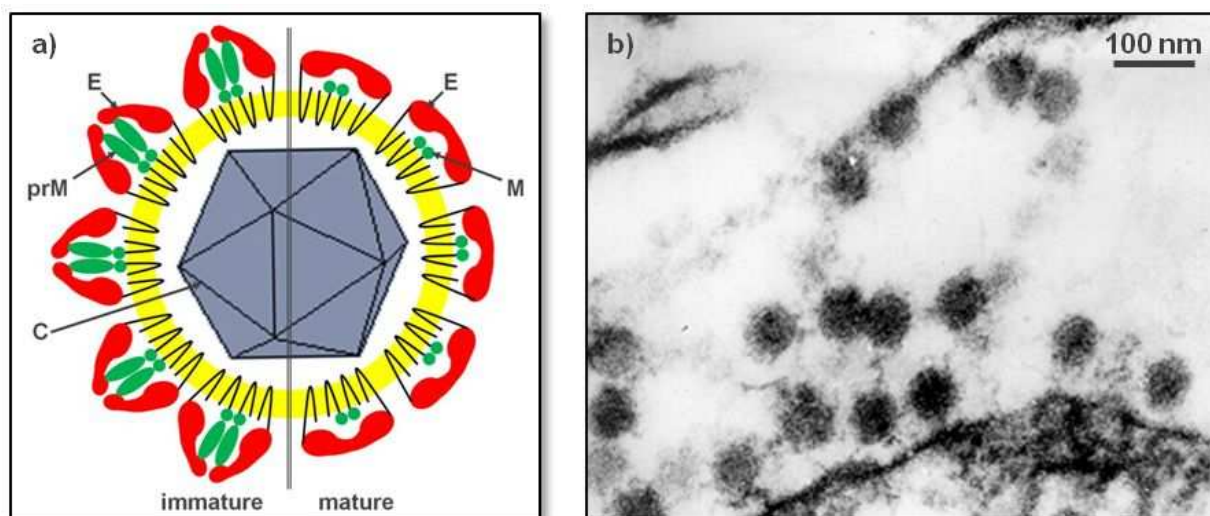


Figure 1. Structural organization of TBEV virions. a) In immature TBEV virions, proteins prM and E form heterodimers, whereas mature virus particles carry protein M and homodimers of protein E (adapted from [12]). b) Electron micrograph of TBEV particles (kindly provided by Elena Ryabchikova, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia)

of about 11 kilobases and contains a single open reading frame (ORF) flanked by 5'- and 3'- untranslated regions (UTR). It carries a 5'-cap but lacks a 3'-poly(A) tail [13]. RNA in the UTRs forms conserved secondary stem-loop structures probably serving as *cis*-acting elements for genome replication, translation, or packaging [14-17]. The ORF encodes a polyprotein of 3,414 amino acids which is co- and post-translationally cleaved into three structural (C, prM, E) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5) by viral and cellular proteases [18] (Figure 2).

Consistent with its role in packaging viral RNA, the C protein is a relatively small protein rich in basic amino acid residues. Its carboxy-terminal region serves as an internal signal sequence initiating translocation of protein prM, consecutively produced during polyprotein synthesis, into the membrane of the endoplasmic reticulum (ER) [18-19]. Although this signal sequence is removed from mature protein C by the viral protease, the protein remains associated with the membrane by virtue of a central hydrophobic domain. This domain is supposed to mediate the interaction of the nucleocapsid with the surrounding membrane and to play a central role during virion assembly [20-21].

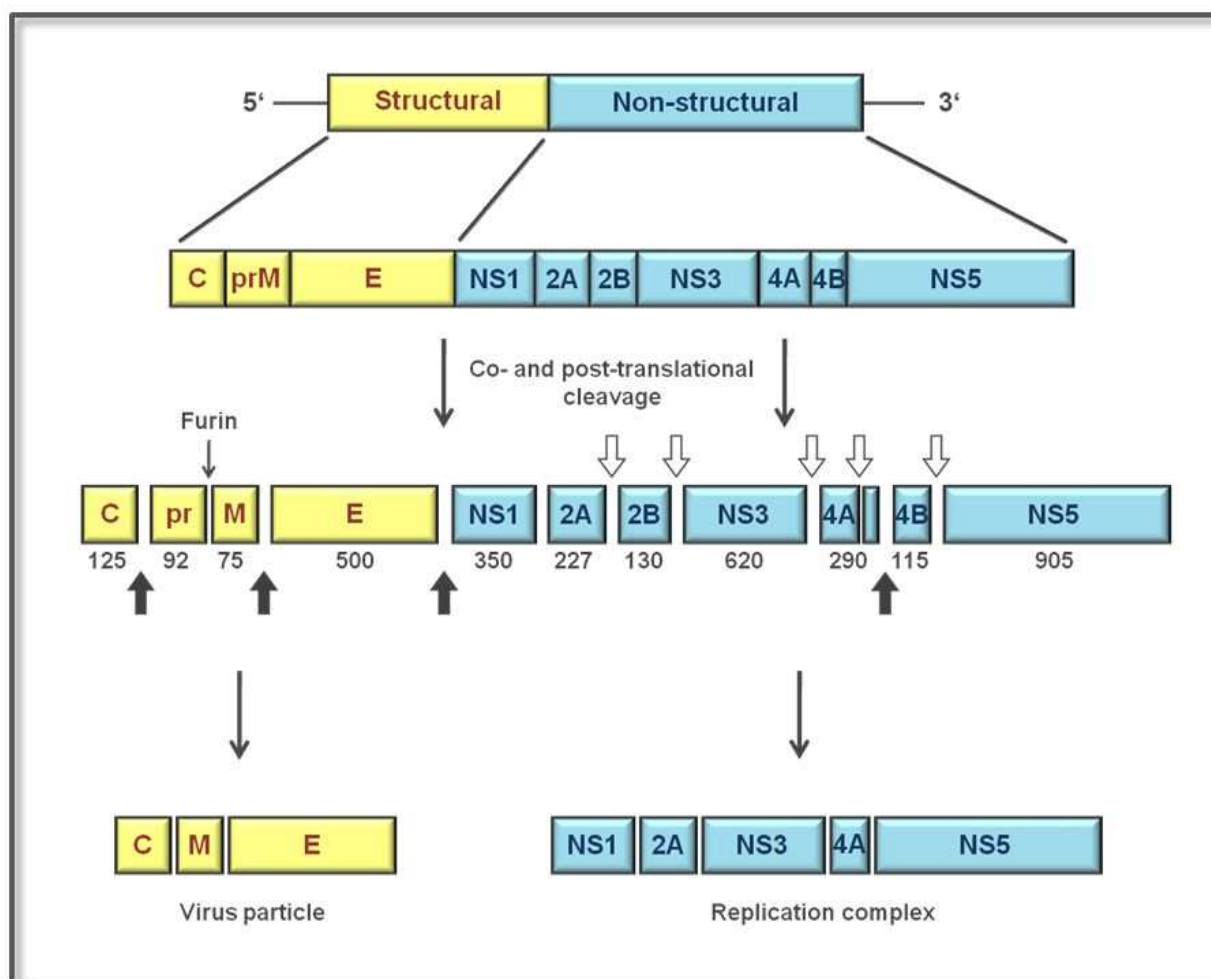


Figure 2. Schematic representation of TBEV genome organization. During replication, the polyprotein produced from the single ORF is co- and post-translationally cleaved to yield the structural and non-structural proteins; grey arrows: cleavage by host signal peptidase; white arrows: cleavage by viral protease (adapted from [22-23]).

prM is a glycosylated precursor of the M protein and shows a chaperone-like role in the folding of the E protein [24]. During virus maturation, protein prM is cleaved twice by cellular proteases to yield the small M protein found in mature virions [25].

The envelope glycoprotein composes the outer surface of TBE viruses and mediates host-cell receptor binding and membrane fusion [18]. It is the main antigenic determinant and a major determinant of virus virulence [26] (see chapter 4.1.4). The E protein exists in a homodimeric form in mature virions but is rearranged to homotrimers during the fusion process. In immature virions, it is found in heterodimeric association with protein prM (see Figure 1a and chapter 4.1.3). Each monomeric subunit of the E protein comprises three domains, designated I, II, and

III, and a C-terminal stem-anchor region anchoring the protein to the membrane. Domain I contains a glycosylation site where the single N-linked glycosylation of the protein takes place. Domain II includes a conserved fusion peptide, and domain III is supposed to serve as a receptor binding area [27] (Figure 3a, b).

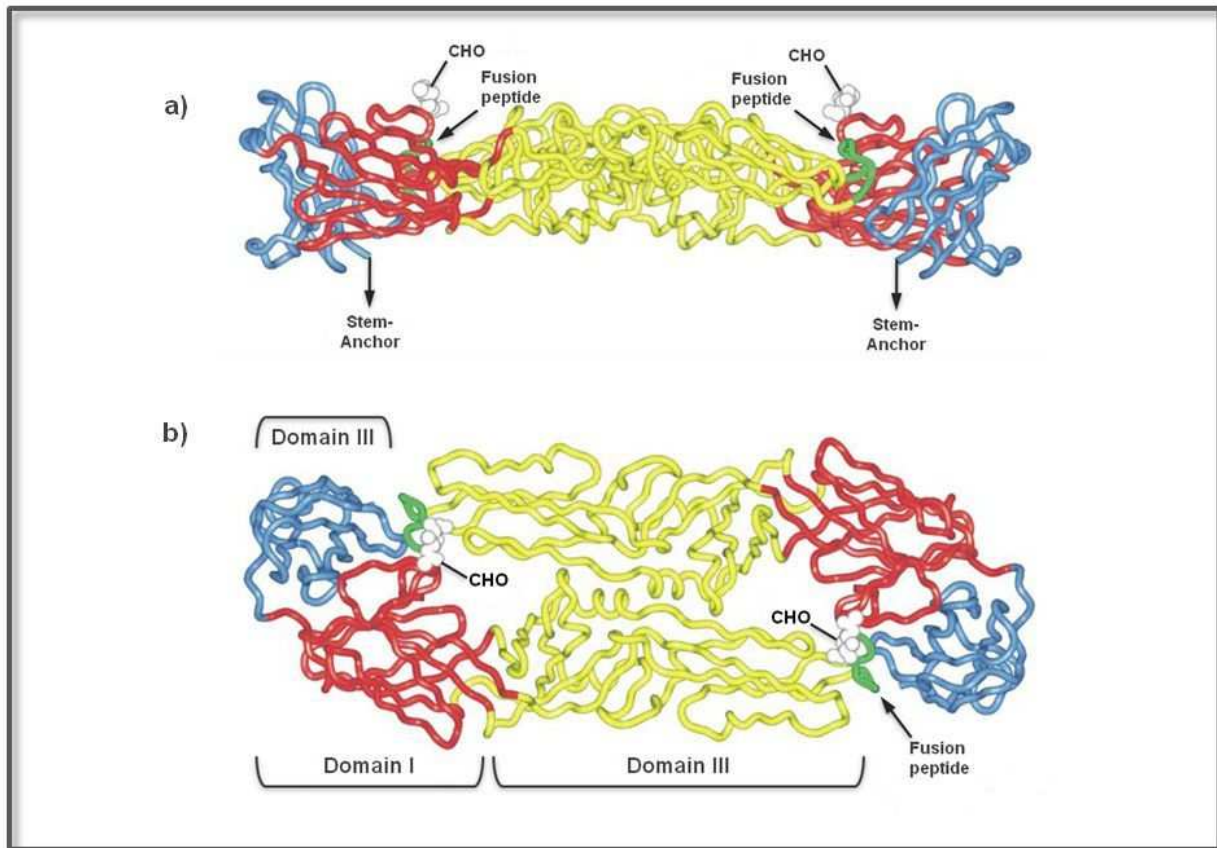


Figure 3. Ribbon diagram of TBEV E protein in its homodimeric form presented in side (a) and top (b) view, as determined by X-ray crystallography [27]. Positions of the fusion peptide and the stem-anchor region are indicated. CHO: N-glycosidically linked carbohydrate side chain (adapted from [28]).

The TBEV replicase complex is formed by the non-structural proteins NS1, NS2A, NS3, NS4A, and NS5 that together fulfill all of the functions required for transcription [18, 29]. Protein NS1 is a glycoprotein existing in homodimeric forms localized freely in the cytoplasm or associated with membranes. In addition, protein NS1 is also secreted into the extracellular space where it forms multimeric forms inducing protective immune responses. Therefore, it has previously been called “soluble antigen” [30-31]. Together with protein NS1, the small, hydrophobic proteins NS2A and NS4A presumably associate the replicase complex to intracellular membranes [18]. Within this complex, protein NS5 acts as an RNA-dependent RNA polymerase [32], whereas protein NS3 serves as helicase and RNA triphosphatase

[18]. Besides, protein NS3 also provides virus-specific serine protease activity for the cleavage of newly synthesized virus polyprotein, with NS2B acting as a crucial cofactor [17]. To present, the function of NS4B is not known.

4.1.3 Virus replication cycle

A schematic representation of TBEV replication in mammalian cells is given in Figure 4.

Infection is initiated by binding of the viral E protein to host cell receptors of not yet sufficiently identified nature. While heparan sulfate has recently been defined to be a major host cell receptor [33], the identification of different polypeptides as putative binding molecules [34-35] suggests that TBEV is able to use multiple receptors for host cell binding. Receptor-mediated endocytosis through clathrin-coated pits transports virions into prelysosomal endocytic compartments of the host cell [36]. The low pH in these vesicles causes a conformational change and reorganization of the E protein from dimers into trimers [37]. The viral fusion peptide is exposed, initiating fusion of the viral envelope with the endosomal membrane and release of the viral nucleocapsid into the cytoplasm [28]. After uncoating and translation of the viral RNA genome, the polyprotein is processed to yield the individual proteins. This initiates viral RNA replication, where full-length negative-strand copies of the genome serve as templates for the production of new positive-strand RNAs. During polyprotein synthesis, the surface proteins prM and E are translocated into the ER lumen, and their amino-termini are released through proteolytic cleavage by host cell signalase. On the cytoplasmic side of the ER membrane, protein C packages the newly synthesized RNA genomes into nucleocapsids, and the viral envelope is acquired by budding of the nucleocapsids into the ER. Immature, non-infectious virions containing proteins prM and E in a heterodimeric association are transported through the host secretory pathway. In the acidic vesicles of the late trans-Golgi network, furin-mediated cleavage of protein prM leads to virus maturation. This final activation cleavage produces protein M and initiates reorganization of protein E to form fusion-competent homodimers. Mature virions are finally released from the host cell by fusion of the transport vesicles with the cytoplasmic membrane [12, 18, 38].

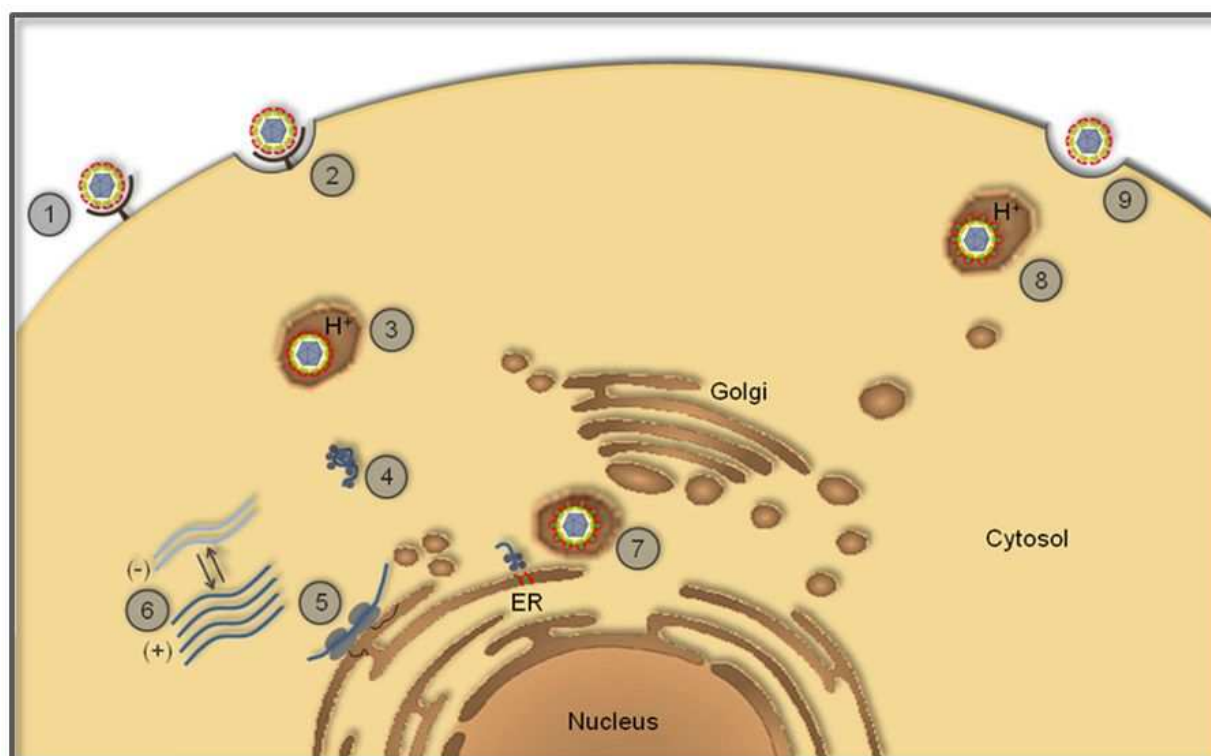


Figure 4. Schematic representation of the TBEV replication cycle within mammalian cells, involving nine steps: 1) binding; 2) entry; 3) membrane fusion; 4) uncoating; 5) translation; 6) RNA replication; 7) intracellular assembly; 8) transport and maturation; 9) secretion (adapted from [39]). For a description of the individual steps, refer to the main text.

The TBEV maturation pathway within tick cells significantly differs from that in mammalian host cells. Most prominently, nucleocapsids are assembled freely in the cytoplasm rather than on the ER, and the envelope is acquired by budding on the cytoplasmic membrane or into cell vacuoles. Also, the virus replication rate is very slow, wherefore the titers reached in tick cells are approximately three orders of magnitude lower than those obtained in mammalian cells [40].

4.1.4 Molecular determinants of virulence

Strains of TBEV are known to considerably differ in their neuropathogenic properties [41-42], and the molecular basis for virus attenuation has received increased interest in recent years. Genomic changes may impair both the ability of the virus to enter the CNS, referred to as neuroinvasiveness, as well as its capacity to replicate within the CNS, referred to as neurovirulence [29]. While virulence studies frequently rely on the molecular characterization of viruses investigated in *in vivo* or *in vitro* experiments, the generation of infectious cDNA clones constitutes a more

direct approach for describing the functional consequences of distinct mutations [43-45].

Early work on TBEV virulence identified amino acid substitutions with potential biological significance scattered throughout the virus genome [42]. Whereas mutations in structural proteins may affect virus stability, binding, and entry, mutations in non-structural proteins possibly cause defects in transcription, translation, or virion assembly [29]. In general, mutations especially in the E protein are supposed to influence TBEV virulence.

The process of receptor binding is a crucial event of virus replication. Accordingly, a number of mutations within the receptor-binding area of the E protein have been shown to affect TBEV neuroinvasiveness [46-48]. For instance, the interaction of TBEV with heparan sulfate plays an important role during the early steps of viral entry into the host cell (see chapter 4.1.3), and mutations enhancing the affinity for this molecule by increasing the positive net surface charge of the E protein significantly reduce neuroinvasiveness [12, 47, 49].

TBEV neuroinvasiveness has repeatedly been shown to be impaired by mutations in the prM/E interface [47, 50-52]. Possibly, these mutations disrupt E protein trimerization during the fusion process or disturb the stability of the glycoprotein network on the virion surface.

As opposed to the numerous mutations attenuating neuroinvasiveness, only limited determinants of TBEV neurovirulence have been identified in the E protein. However, this characteristic is known to be affected by alterations of the E protein glycosylation site, resulting in a reduced glycoprotein expression [53].

Although less extensively studied, molecular determinants of virulence have also been identified in the structural C and prM proteins of TBEV. Mutations within the prM furin as well as the prM/E host signal peptidase cleavage site attenuate virus virulence, most likely by interfering with correct protein processing during virion maturation and therewith reducing the amount of infective particles produced [45, 54]. Furthermore, significant attenuation of TBEV neuroinvasiveness is caused by deletions within the central hydrophobic domain of the C protein, disturbing the assembly process and thus decreasing the production and physical stability of infectious particles [20].

Virus replication and therewith its virulence is susceptible to mutations in the non-structural proteins, affecting the formation of a stable replicase complex or directly disturbing the enzymatic activity of viral proteins. For example, alterations in NS1 possibly destabilize the replicase complex, resulting in reduced replication kinetics [53]. Defects in viral replication are also caused by mutations within the conserved domain of NS2B, eliminating its ability to associate with NS3 to form the viral protease (shown for Yellow Fever virus, *flavivirus*) [55]. Likewise, mutations within the substrate binding pocket of NS3 itself severely inhibit viral protease activity [56]. Recently, substitutions within the NS2B and NS3 genes have been confirmed to reduce neuroinvasiveness in natural TBEV isolates [57]. Finally, mutations within the conserved core region of the 3'-UTR which plays a crucial role in RNA replication [58] have been implicated in virus attenuation [44, 59].

4.2 Ecology

TBEV is a vector-borne pathogen, with *ixodid* ticks serving as both the principal carrier as well as reservoir of the virus [2]. In western Europe, TBEV is principally transmitted by the tick species *Ixodes ricinus*, whereas *Ixodes persulcatus* is the primary vector of the Far Eastern and Siberian virus subtypes [60]. Sporadically, TBEV has also been isolated from several other tick species as well as from other parasitic invertebrates [17, 61].

In consequence of its very specific route of transmission, the epidemiology of TBEV is closely associated with the ecology and biology of vector ticks, the areas of their dissemination, and periods of tick feeding activity [62]. Therefore, the biology and life cycle of the European subtype TBEV vector tick *I. ricinus* are described here, along with the circulation of the virus in the ecosystem. Also, the issue of rapid virus-host adaptation is addressed.

4.2.1 Biology and life cycle of the virus vector *Ixodes ricinus*

I. ricinus inhabits specific foci within deciduous forests of central and western Europe, where particular macro- and microclimatic conditions coincide with the presence of a proper combination and density of vertebrate hosts. Generally, *I. ricinus* can be found in geographic regions ranging from 39 to 65 degrees of latitude (north), extending to 60 degrees of longitude (east) [63], and reaching 1,500 meters

above sea level in altitude [64]. Circulation of ticks within these regions is restricted to definite zones meeting specific climatic conditions, resulting in a discontinuous distribution. Also, the dissemination of ticks within a habitat is not uniform [17, 60].



Figure 5. Developmental stages of *I. ricinus*: larva, nymph, adult male, adult female (from left to right).

Although *I. ricinus* is highly cold-adapted, its rate of development is temperature-dependent. Ticks undergo diapauses in winter but become biologically active at temperatures above 7°C [63, 65]. The lower limit of relative humidity for survival lies between 70 and 80 %, making *I. ricinus* very sensitive to moisture stress [66] and entailing cessation of any activities during prolonged dry spells. On these climatic conditions, throughout Europe, peak feeding times occur between May and June and also between September and October [17].

The life cycle of *I. ricinus* proceeds through three developmental stages (larvae hatching from eggs, nymphs, and adult males or females) (Figures 5, 6), where the major requirement for molting and entering the next stage is the uptake of a blood meal from a vertebrate host. Each stage feeds on a different individual host for a period between four to six (larva) and five to fourteen days (adult female). The duration of each stage is typically one year, wherefore the completion of the entire developmental cycle generally takes three years. However, it may vary from two to six years, depending on climatic conditions and geographic location [67].

Under natural conditions, *I. ricinus* may act as a parasite on more than two hundred different species, including humans. Larval ticks preferentially parasitize small mammals, whereas nymphal ticks can also be found on larger mammals, birds,

or lizards. While adult female ticks especially infest red or roe deer, adult male ticks only rarely take up small amounts of blood or tissue fluid on these hosts [68-69]. Adult male and female ticks mate before or during the act of feeding, where after female tick deposits 2,000 to 3,000 eggs in the loose top layer of the soil [66].

4.2.2 Circulation of TBEV in the ecosystem

In the environment, TBEV is maintained within so-called natural foci in cycles involving ticks and wild vertebrate hosts, thereby depending on the coincidence of certain botanical, zoological, climatic, and eco-geological conditions [70]. Generally, transmission of TBEV infections relies on two routes: vertical (from eggs to larvae and from larvae to nymphs and adult ticks) and horizontal (from tick to tick, from tick to vertebrate host, or vice versa) [71] (Figure 6).

Ticks are infected during the process of feeding, where after the virus enters and replicates in cells of the midgut wall and, in a later stage, also infects the salivary glands, assuring further virus transmission in the tick saliva during the next feeding [72]. Besides infecting their vertebrate hosts, infected ticks are likely to pass on the virus to non-infected ticks during co-feeding on the same host. This transmission process does not necessarily require a detectable viremia but instead may also be mediated by migratory cells infiltrating the tick feeding sites [73]. Furthermore, TBEV is possibly transmitted from infected fertilized females to their progeny [74]. Thus, if infected with the virus, ticks remain infected throughout their life cycle and support circulation of TBEV in the tick population by co-feeding, viremic, and transovarial transmission [17].

Virus endemism within TBE foci importantly depends on sufficient transmission between ticks and vertebrate reservoir hosts. In contrast to indicator hosts developing only brief viremia with low virus production, reservoir hosts are sensitive to TBEV and able to multiply the virus, exhibiting viremia for a long period of time without becoming clinically ill [75]. Natural reservoir hosts of TBEV include rodents (*Clethrionomys*, *Apodemus*, *Mus*, *Microtus*, *Micromys*, *Pitymys*, *Arvicola*, *Glis*, *Sciurus*, *Citellus*), insectivores (*Sorex*, *Talpa*, *Erinaceus*), and carnivores (*Vulpes*, *Mustela*) [62, 76]. Accidental TBEV hosts such as humans do not participate in virus circulation in nature but may develop a clinically inapparent or apparent infection with viremia [62].

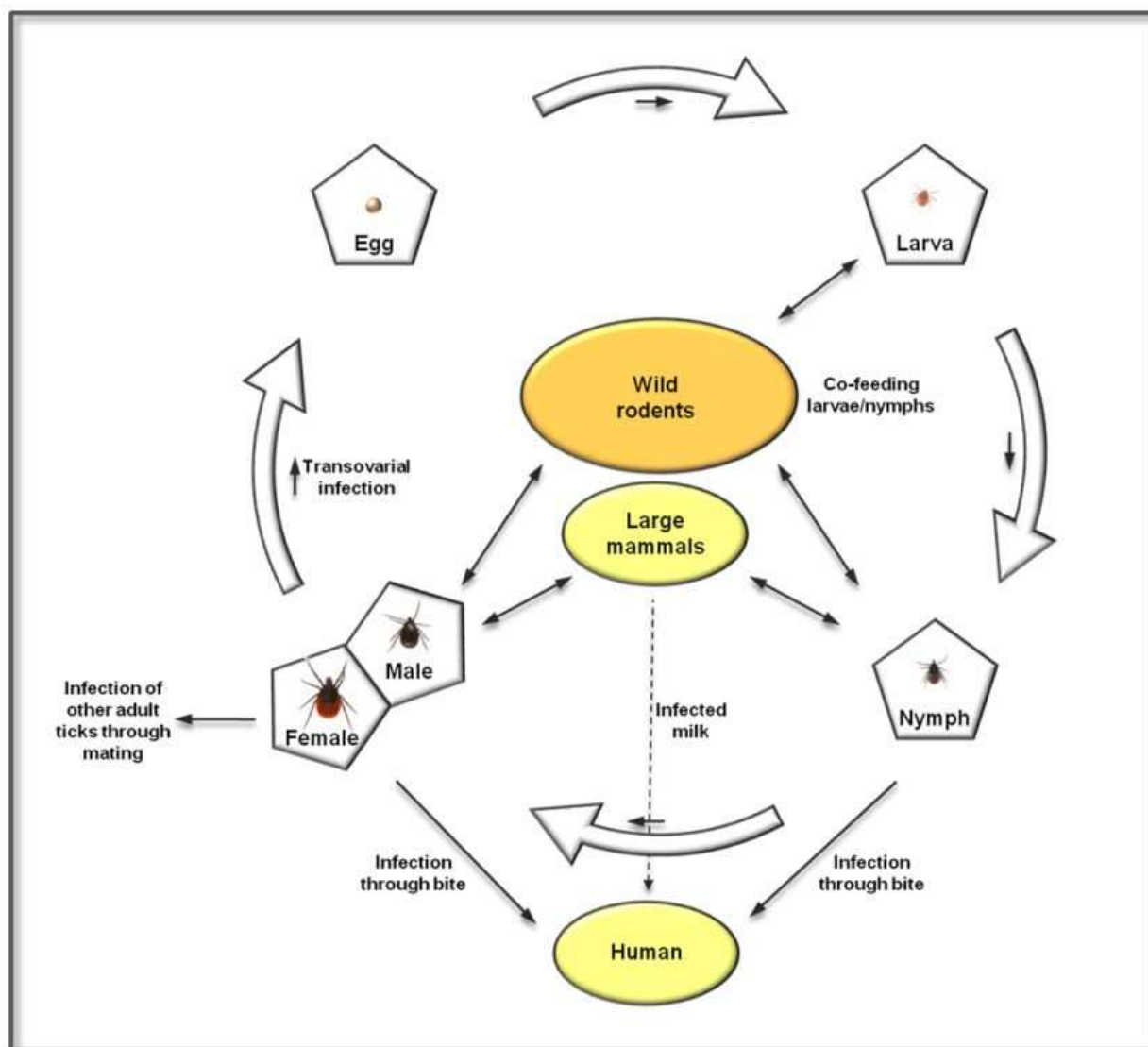


Figure 6. Life cycle of *I. ricinus* and transmission cycle of TBEV. White arrows indicate the sequential development of ticks from the fertilized egg to the adult stage. In each developmental stage, ticks feed on a suitable vertebrate host. Black arrows specify the possible transmission routes of TBEV (adapted from [38]).

The maintenance of TBEV within a focus is significantly regulated by a coincident feeding of larvae on rodent hosts alone or alongside with infected nymphs [77]. Temperature profiles characterized by a rapid fall in ground-level temperatures from August to October seem to enhance the synchrony in the seasonal activity of larval and nymphal *I. ricinus* ticks and therewith constitute a key determinant of the focal distribution of TBEV [78]. Interestingly, microclimatic conditions have also been described to directly affect the infection and virus propagation rate in ticks as well as the rate of pathogen transmission [79-80]. This emphasizes the significance of abiotic factors in the preservation of TBE foci.

Although larger animals such as birds, deer, and horses may serve as hosts for ticks, they are not known to play an important role in virus transmission [17]. In fact, the density of such hosts may positively or negatively affect the circulation of TBEV. While facilitating virus transmission by amplifying the tick population, they may also decrease the tick feeding rate on rodents being the pathogens' most important reservoir hosts [71]. The potential of TBEV to persist and spread in endemic foci is thus restrained by the low probability to infest reservoir hosts [81] and by the relatively short duration of the infectious period in such hosts [82], with viremia normally lasting for two to eight days [83]. However, small mammals may maintain a persistent infection with the virus [84], suggesting an important role of latent TBEV in natural foci. Also, the virus is possibly transmitted via both the sexual and the placental route in wild rodents [85]. Infected vertebrate hosts may change their behavior or specific odor, thereby modifying their risk of repeatedly being attacked by ticks [86]. Likewise, TBEV presumably stimulates the questing activity of the tick [87], increasing effectiveness of pathogen transmission. The virus infection rate of ticks removed from humans has been reported to be about 20 times higher than in questing ticks from the same area [88]. On the other hand, the transmission pattern of TBEV may restrictively be influenced by resistance of vertebrate hosts to both the tick-borne pathogen and the tick itself [89].

Generally, the prevalence of TBEV-infected *I. ricinus* ticks within endemic foci is relatively low, for example reaching mean infection rates of 0.46 % in Switzerland [90], 0.5 to 2 % in Germany [88], 1.7% in Lithuania [91], 2.4 to 3 % in Latvia [92], or 4.2 % in Poland [93]. However, infection rates up to 14.3 % have been recognized in an isolated focus in Switzerland [94], and a prevalence as high as 26.6 % was observed in adult *I. ricinus* ticks in Latvia [95]. In *I. persulcatus* ticks, on the other hand, high virus prevalences are regularly observed, reaching up to 40 % in certain regions of Russia [2]. *Ixodid* ticks may maintain double infections and thus transmit more than one pathogen to their host, with the most common coinfections being TBEV and *Borrelia spp.* as well as TBEV and *Coxiella burnetii* [96].

4.2.3 Microevolution of TBEV

The maintenance of TBEV within a focus significantly depends on both its ability to persistently infect vector ticks as well as its capacity to quickly replicate in

vertebrate hosts upon transmission, preferably producing pronounced viremia. The process of host alternation is therefore likely to select for a virus population being well adapted to both systems [97]. In fact, TBE viruses isolated from questing ticks are known to comprise a heterogeneous population of variants differing in their virulence properties in mammals [98].

TBEV spends most of its life cycle in ticks, infecting them chronically for the duration of their life. Upon mammal-to-tick transmission, the phenotypic characteristics of the virus rapidly change, resulting in a noticeable decrease in vertebrate virulence [51, 97]. However, the virulent phenotype is restored when the attenuated virus is re-transmitted to and reproduces in mammals [99]. Interestingly, different TBEV subtypes (European, Siberian, Far Eastern) vectored by different tick species (*I. ricinus*, *I. persulcatus*) are known to vary in both disease morbidity and mortality rates in humans, suggesting that different pathogenic properties of these subtypes might be a result of adaptive evolution of viruses to their vector ticks [17].

Since host adaptation results in considerable changes in the pathogenic properties of TBEV, variations in the molecular determinants of virus virulence are likely involved. Specifically, substitutions increasing heparan-sulfate binding properties of the virus and therewith significantly reducing neuroinvasiveness in mammals (see chapter 4.1.4) appear to be concerned with the adaptation of TBEV to ticks [51, 97]. An increase in the neuropathogenic potential of TBEV upon replication in mammals may also result from substitutions within the viral protease (NS2B/NS3) [100]. However, rapid phenotype conversion ensuring the high level of virus adaptability unlikely relies on random mutagenesis during the process of host alternation. Instead, virulent and naturally attenuated viruses most likely co-exist as variants, or quasispecies, and rapid virulence conversion during host adaptation is mediated by selection from the quasispecies population. Variants less adapted to the actual host are not eliminated but rather replicate at background levels, with the potential to re-emerge upon the next host switch [57, 97].

4.3 Epidemiology

During the last few thousand years, TBE viruses have evolved and dispersed from east to west across the Eurasian continent [101], thereby emerging as a pathogen currently causing at least 11,000 human cases of encephalitis in Russia

and about 3,000 annual cases in the rest of Europe [17]. Predictive risk mapping comprising the influence of climate change suggests that TBE endemic areas will contract to increasingly high latitude and high altitude regions, until by the 2080s the disease no longer occurs in mainland Europe but is confined to parts of Scandinavia [102]. This chapter, however, considers the present geographical distribution of TBE, summarizes the factors influencing disease incidence, and provides information on TBE monitoring and surveillance activities.

4.3.1 Geographical distribution and molecular phylogenetics

TBE occurs in an area ranging from northern China and Japan, across far eastern Russia, to central and western Europe and Scandinavia [4, 103-104] (Figure 7). Specifically, the disease is endemic in Austria, the Czech Republic, Estonia, Finland, Germany, Hungary, Latvia, Lithuania, Poland, Russia (particularly western Siberia and Ural [61]), Slovakia, Slovenia, Sweden, and Switzerland. Sporadic disease cases have also been reported from France, Italy, Greece, Norway, Denmark, Bulgaria, Croatia, Romania, Serbia, China, and Japan [105-106]. A spread of endemic areas as suggested by predictive risk mapping [102] has recently been confirmed in Denmark [107]. To date, the northernmost area of circulation of TBEV has been identified in Simo, Finland, which is situated about 100 km south of the polar circle [108].

Generally, the dissemination of TBEV correlates with the distribution of *ixodid* vector ticks (Figure 7). While *I. ricinus* is the predominant tick species in most parts of Europe, *I. persulcatus* is principally found from Japan and China to eastern Europe [109-110]. Accordingly, the European subtype of TBEV is primarily found throughout Europe, whereas the Siberian lineage is by far the most prevalent in both the western and central parts of Russia [108]. The Far Eastern subtype prevails in the far eastern parts of Russia [108], circulates in western and south-western China [103], and is endemic in the northern regions of China and in Japan [104]. *I. ricinus* and *I. persulcatus* coexist in northeastern Europe, the east of Estonia and Latvia, and in several European regions of Russia [95, 105, 111-113]. Consequently, all three lineages of TBEV could be detected in many parts of Russia [108] and are known to co-circulate in endemic areas in Estonia and Latvia [95, 111]. The Siberian subtype is even found as far northwest as Finland [113]. Interestingly, European subtype TBE

viruses have recently been detected in the *I. nipponensis* population in South Korea [114]. The involvement of this unusual vector tick and the presence of the European instead of the Far Eastern subtype underline the emerging character of TBEV.

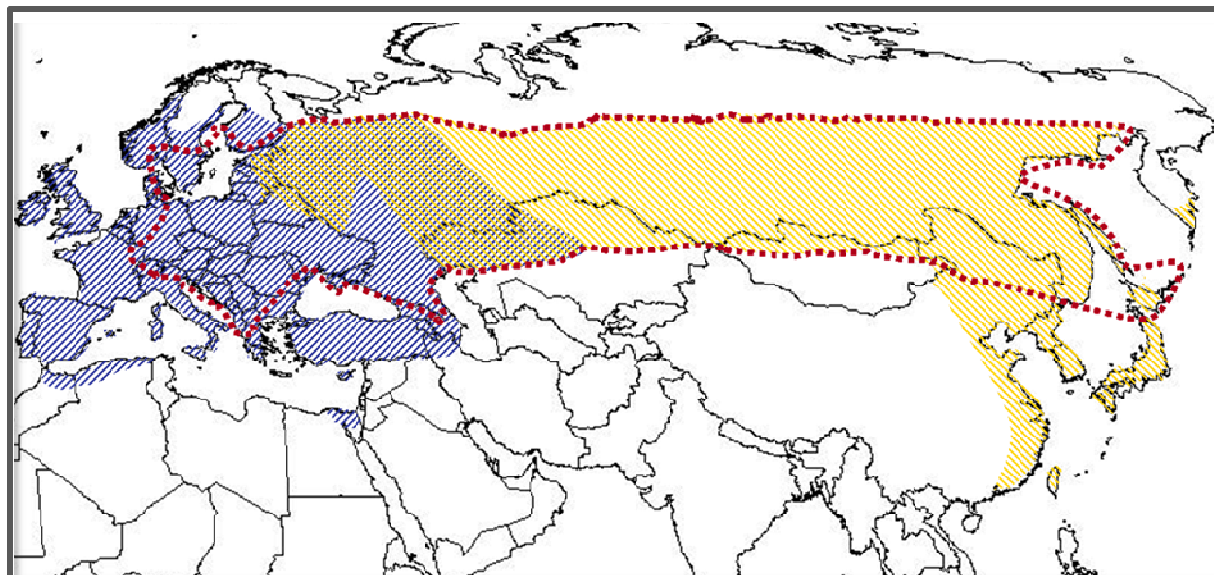


Figure 7. Geographical distribution of TBE and its natural reservoirs. Western distribution of *I. ricinus* is shown in blue, eastern distribution of *I. persulcatus* is marked in yellow. Distribution of both vectors overlaps in the checkered area. The red dotted line indicates the border of TBE endemic areas occurring in patterns of natural foci. Distribution of *ixodid* ticks in China is uncertain (adapted from [105]).

Despite their wide geographic distribution and the clear separation into three subtypes, TBE viruses show a high level of stability and antigenic homogeneity [9, 60, 115-117]. Major limitations imposing selective pressure and thus supporting genetic conservation are given by the prolonged tick life cycle and the fragile transmission cycle of TBEV within endemic foci (see chapter 4.2.2). Whereas the degree of variation is especially low among European subtype viruses, Far Eastern and Siberian subtype TBEV are more diverse, with the latter comprising at least two distinct lineages (Baltic and Siberian) [118]. However, TBEV subtypes clearly represent variants of a single virus species. The Siberian and Far Eastern subtypes share a common ancestor and are more closely related to each other than to the European subtype, which, on the other hand, is more closely related to Louping ill virus [10].

Many studies on the molecular epidemiology of TBEV have focused on the E glycoprotein. The degree of amino acid variability within this protein is low, reaching

maximum difference of 5.6 % between members of the different subtypes or 2.2 % between different European subtype viruses. Variability is higher at the nucleotide level, ranging from 1 to 16.9 % between different subtypes [9]. For instance, the nucleotide sequence identity between different Swiss TBEV ranges from 96.3 to 100 % [119], the identity among different Lithuanian isolates was found to be 97.7 % [91], Swedish isolates show an identity of 97.7 to 98.0 % [112], comparison of different European subtype isolates from Estonia revealed an identity of 98.1 to 98.7 % [111], and a Norwegian and a Danish strain are identical at 98.6 % of the E gene sequence [120]. Phylogenetic studies have also been based on the viral polymerase, and a robust analysis similar to that obtained from whole genome sequences can be derived from studies based on the nucleotide sequence of NS3 [10, 121]. A substantial variability of 55.5 % within partial 5'-UTR and C protein-coding regions has recently been demonstrated among TBEV isolated from a single endemic focus in Switzerland, possibly reflecting a strategy for the selection of the fittest viruses [94]. All together, comparison of viruses at the molecular level allows for the understanding of evolutionary patterns and may give insights into population dynamics within endemic areas.

4.3.2 Disease incidence

The incidence of clinical TBE cases varies from year to year and in different geographic regions, depending on several risk factors [17]. A key determinant of disease incidence is the number of human exposures to infected ticks. Accordingly, the rate of infections coincides with seasonal peaks of tick feeding activity [17]. The length of time spent by the tick feeding on the host may influence disease incidence, although even a brief attachment can result in the development of TBE [122]. The most important risk factor affecting the proportion of humans developing clinically apparent disease, however, is the infection prevalence and concentration of infectious virus within ticks. A high abundance of ticks with a high infectivity occurs in so-called nuclei of natural foci. Within these nuclei the tick density is much higher than in the surrounding areas, providing a more intensive circulation of TBEV [123]. Generally, about 1 to 2 % of people getting bitten by a tick in an endemic region develop clinical disease [124].

During the last two decades, an increase in disease incidence has been observed in most European countries. The most dramatic changes have been reported in Lithuania and Poland, where the number of registered cases multiplied by factors of 69 and 30, respectively. A pronounced increase (3– to 7–fold) was also observed in the Czech Republic, Estonia, Finland, Germany, Slovakia, and Sweden. Furthermore, sporadic cases of TBE have been reported in Norway and Denmark during the last 10 years, where the disease was first described in 1998. On the other hand, a slight decrease in disease incidence has been observed in Hungary and Russia from the 1990s to the 2000s [125]. In Switzerland, first human disease cases have been described in 1969 [126]. Since then, TBE incidence continuously increased, peaking in a maximum of 245 registered clinical cases in 2006. During the past three years, about 110 to 120 annual disease cases have been reported [127].

The apparent increase in TBE incidence is attributable to a complex interaction of ecological, social, political, economic, and demographic factors [62]. Most prominently, climate change aids the spread of tick-borne diseases by affecting both the tick and the rodent population dynamics [4]. Warmer temperatures may change the seasonal pattern of tick questing activities, accelerate the tick developmental rates [128-129], or change the prevalence of TBEV infections in ticks [78-79] (see chapter 4.2.2). Also, the observed shift of the upper limit of geographical habitats of ticks is relatable to climate warming [130]. On the other hand, variations in weather markedly alter human activities. The growing popularity of outdoor pursuits as well as changes in land usage such as intensified forestation may increase the contact between people and ticks [4, 38]. Human behavioral responses to weather favorable for outdoor activities are thought to be responsible for the remarkable peak in TBE incidence observed in Switzerland, Germany, Poland, Slovenia, and the Czech Republic in 2006 [129]. However, although climate change may provide a generally more permissive environment for TBEV transmission, it does not explain the spatio-temporal inhomogeneity in epidemiological changes. Instead, this heterogeneous pattern is more likely explained by the variable contribution of several additional factors [131]. For instance, increased environmental awareness resulting in reduced industrial pollution and a decrease in the use of pesticides may have a positive effect on the tick habitat and rodent host population. Changes in hunting practices may lead to an increase in larger mammal populations, which in turn amplifies the tick population and therewith facilitates TBEV transmission [132].

Moreover, the probability of TBE infection depends on socio-economic factors such as dissimilar vaccination rates among people with high or low incomes [133]. Increased mobility of people travelling to endemic areas additionally adds to the risk of infection. Furthermore, migrating birds carrying TBEV-infected ticks may aid the spread of the disease [134]. Alternatively, the reporting of TBE cases may be influenced by an increased public and medical awareness as well as by improved diagnostics and disease surveillance systems in many countries [62, 106].

4.3.3 Disease surveillance

Despite the increasing endemicity of TBE in Europe, surveillance and notification schemes are not uniform and thus may affect the prevalence estimates in different countries [106, 135]. Importantly, the lack of a standardized case definition, varying diagnostic procedures, and wide differences in the quality of national surveillance programs complicate comparison of surveillance data throughout Europe [106]. Since TBE-endemic areas do not cover the entire geographic area of the European Union (EU), TBE is not included in the list of notifiable diseases at the EU-level [108]. In Switzerland, however, as in 15 other European countries, TBE is classified as a notifiable disease, with notification being mandatory since 2001. On the other hand, the lack of a clearly formulated case definition may involve an under-ascertainment of disease cases. TBE vaccination is included in an official governmental vaccination program in Switzerland, with health insurance companies covering the costs for people who are at risk of exposure to ticks in endemic areas [106]. To date, the vaccination coverage in Switzerland is about 17 %, as opposed to 88 % in Austria, where a mass vaccination campaign was initiated in 1981 [136]. Vaccination is recommended for people living in or travelling to endemic areas throughout Switzerland. These recommendations require the availability of risk profiles based on epidemiological data. As in many other countries, the description of clinical cases and their geographic location is principally used as an indicator for predicting endemic foci in Switzerland [106]. By publishing a risk map updated annually on the basis of reported human disease cases, the Federal Office for Public Health (FOPH) informs citizens and visitors on the endemic status of the country [137] (Figure 8).

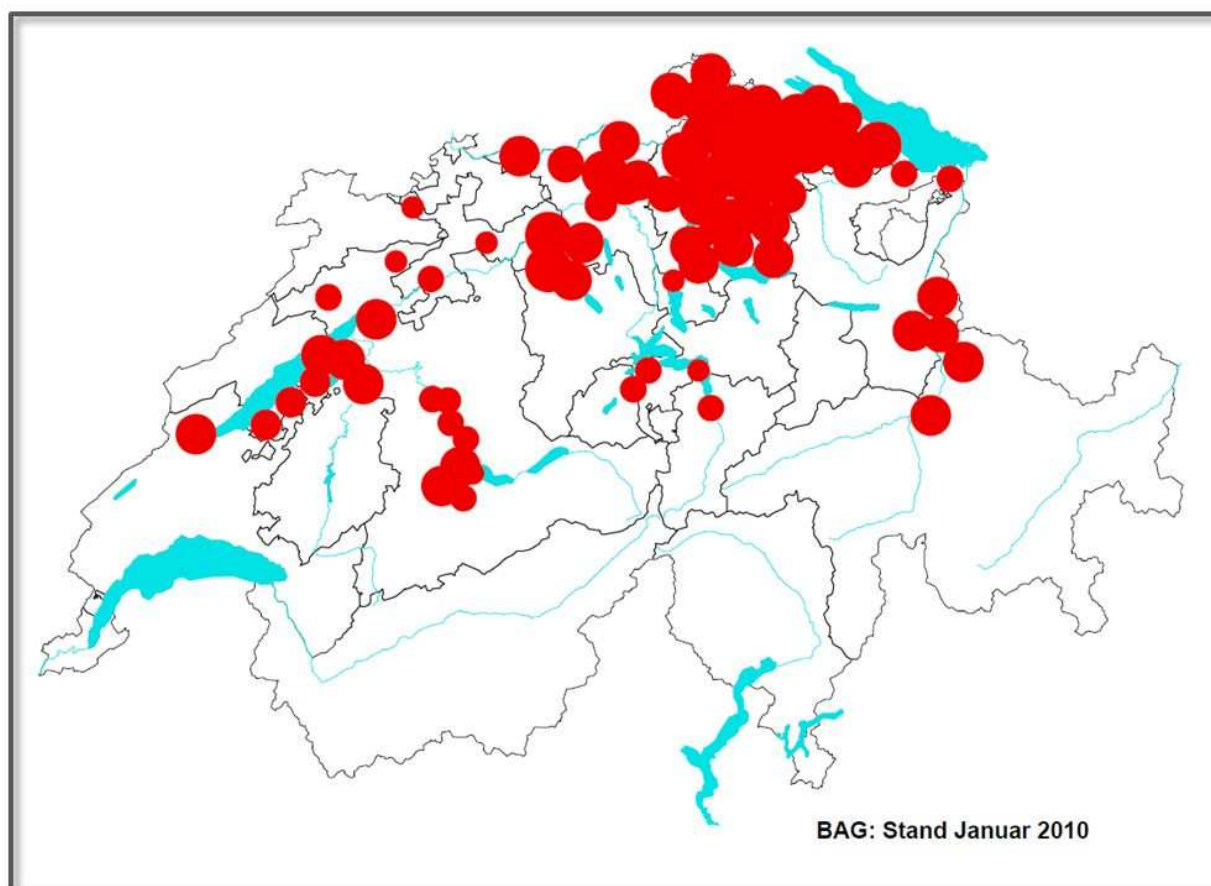


Figure 8. Risk map illustrating established endemic foci of TBE in Switzerland, as defined by geographic mapping of disease cases and published by the Federal Office for Public Health [137].

Due to the introduction of mass vaccination programs, the incidence of TBE may decrease in future. Therefore, the introduction of tick or animal reservoir surveys as alternative indicators for risk assessment should be implemented in national surveillance systems, as initiated in Switzerland, Germany, Latvia, and Slovakia [90, 95, 106, 138-139].

4.4 Description of the disease

When transmitted to humans, TBEV can cause disease of variable severity, ranging from subclinical infections to severe courses with neurological involvement and potentially fatal outcome [17]. This chapter reviews the characteristics of TBE, from the process of infection up to the clinical manifestation of the disease. Important aspects of disease pathogenesis and host immune response are addressed, along with disease diagnosis, treatment, and prevention.

4.4.1 Routes of infection

Under natural conditions, humans are most likely infected with TBEV by the bite of an infected tick when walking through the dense vegetation in forests [17] (see Figure 6). Thereby, ticks preferentially attach to the arm and knee bends, to the gluteal and genital regions, as well as to ears and the hair-covered portion of the head. The virus is transmitted from tick saliva during the first minutes of feeding. This process is indirectly promoted by the action of pharmacologically active molecules secreted in the tick saliva, which modify the microenvironment within the skin site where ticks attach and feed. The tick pharmacopoeia of anti-haemostatic, anti-inflammatory, and immunomodulatory molecules includes immunoglobulin (Ig)- and histamine-binding proteins, interferon regulators, as well as natural killer cells and complement inhibitors. These substances act together to facilitate tick blood feeding and pathogen transmission [140].

Another natural route of human TBEV infection is associated with the consumption of unpasteurized goat, sheep, and cow milk. Whereas cows only secrete low amounts of virus to the milk for up to 6 days post infection (p.i.), TBEV can be isolated from goat milk in significantly higher titers and for a considerably longer period (5 to 25 days p.i.). Also, the virus remains infectious in various milk products such as yoghurt, cheese, and butter [17, 141-142]. TBE virions are known to preserve at least residual infectivity over a pH range of 1.42 to 9.19 and are stable in normal gastric juice (pH 1.49 to 1.80) for up to two hours [141, 143]. Therefore, the human digestive tract is an efficient route of infection.

In addition to these natural pathways of transmission, TBE may also be acquired accidentally during laboratory investigations [144]. Specifically, accidental infections may be associated with needle-stick injuries during experimental infection of animals. Moreover, broken bottles or ampoules containing high virus concentration or freeze-dried samples are a potential source of aerosol infections [145-146].

4.4.2 Pathogenesis

Upon introduction into the skin of tick vertebrate hosts, TBEV first replicates in localized dendritic cells of the skin, and in neutrophils. Epidermal Langerhans cells are likely to transport the virus to draining lymph nodes and therewith initiate the spread of infection via the lymphatic system [147]. After further virus replication in

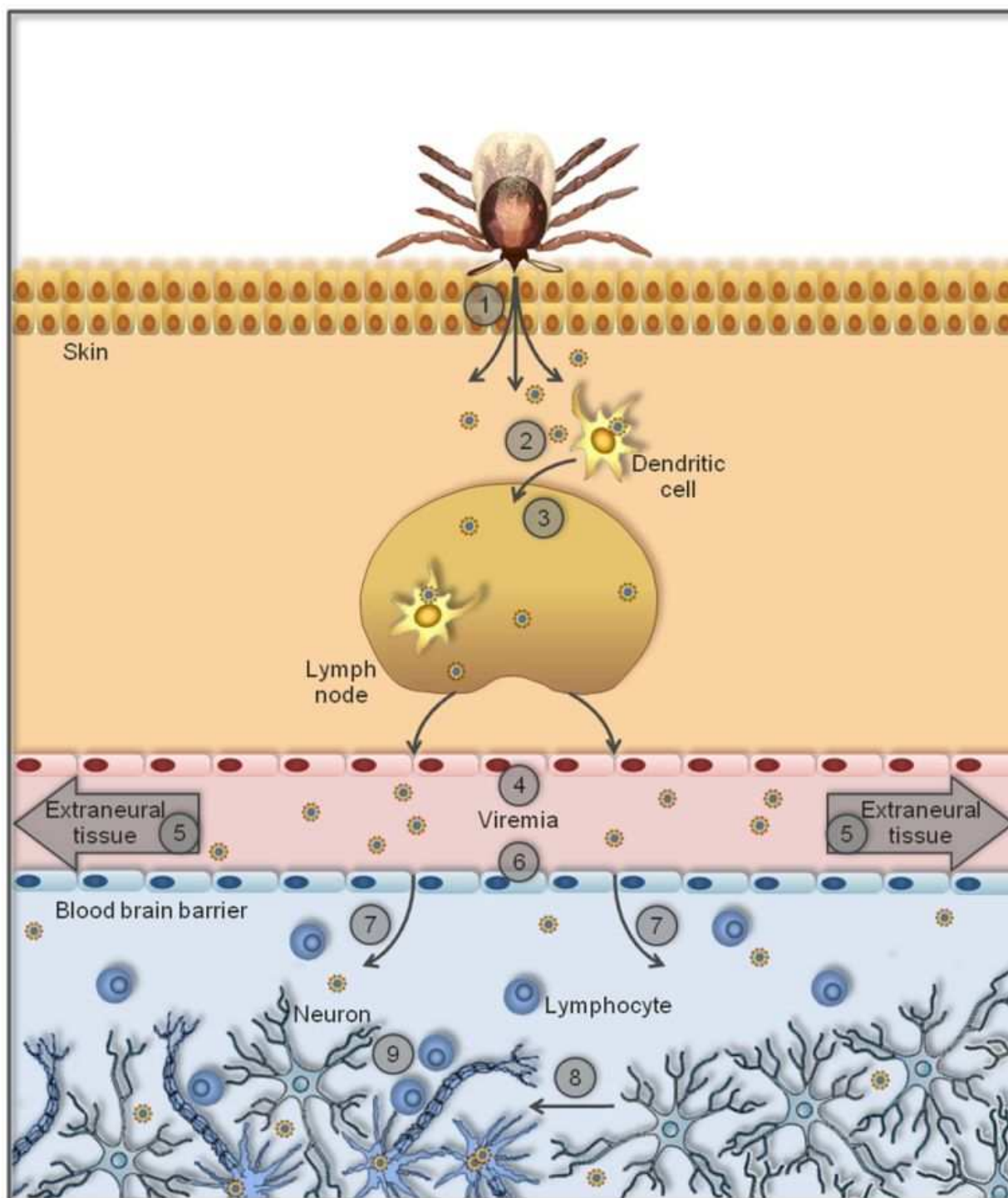


Figure 9. Schematic representation of the pathogenesis of TBE. Following infection by the bite of an infected tick (1), TBEV replicates in localized cells of the skin (2). The virus is then transported to the regional lymph nodes (3) and further replicates in lymphatic tissues, before it induces viremia (4). Many extraneural tissues are infected (5), and massive virus replication results in secondary viremia (6) during which the virus may cross the blood brain barrier (7). Within the central nervous system, infection of neurons causes neuronal cell death (8). The action of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes may further contribute to neuronal damage (9) (based on [148]). For detailed information on the individual steps, refer to the main text.

T-cells, B-cells, and macrophages within the lymphatic organs (lymph nodes, thymus, and spleen), the virus spreads through the efferent lymphatic system and the thoracic duct to produce viremia [149]. During the viremic phase, many extraneural tissues are infected, and the release of virus from these tissues enables viremia to continue for several days [150]. Consequently, TBE virions invade other susceptible organs, especially the reticuloendothelial system (spleen, liver, bone marrow), where massive virus replication takes place. It is during the resulting phase of secondary viremia that the virus may cross the blood brain barrier (BBB) to invade the CNS, where viral replication causes inflammation, lysis, and cellular dysfunction [1, 38] (Figure 9).

CNS pathology of TBEV infections involves two distinct properties: whereas the ability of the virus to replicate in peripheral tissues, induce viremia, and invade the CNS is referred to as neuroinvasiveness, the ability to initiate cytopathic infection of CNS cells and to cause encephalitis is referred to as neurovirulence [23, 29, 151]. Although neuroinvasion in humans has been well reported [152], the mechanisms by which an acute febrile disease develops into a severe CNS infection are not clearly understood. However, the neuroinvasive potential of TBEV is intimately linked to its ability to replicate in particular cell types of peripheral tissues. Inefficient viral replication in dendritic cells, for instance, results in a delayed onset of viremia and may allow the immune system to clear the infection before the onset of encephalitis [29]. Thus, any changes within the genome of TBEV which affect virus replication and spread may significantly alter its pathogenicity (see chapter 4.1.4). On the other hand, aspects such as the general state of health or the age of the infected person may influence the course of disease (see chapter 4.4.4).

The mechanisms by which TBEV crosses the BBB are not clearly understood. However, since the development of encephalitis clearly correlates with the level of viremia [153] and viral antigen simultaneously appears at several sites within the CNS [154], direct hematogenous spread, possibly involving infection of endothelial cells of the BBB [147, 154-155], is a probable route of infection. Alternatively, TBEV may enter the CNS by retrograde spread along the olfactory nerve. In this pathway, the olfactory neuroepithelium becomes infected during the viremic phase, allowing the virus to infect olfactory neurons and subsequently reach the CNS by cell-to-cell spread [156]. A dissemination from the nasal mucous via olfactory nerves to the brain likely explains the short incubation period and the often extremely severe course of laboratory-acquired aerosol infections [157].

Interestingly, although lymph nodes play an important part in the pathogenesis of TBE, virus replication is not accompanied by any specific histological changes, including any destruction of cells, in these organs [158]. On the other hand, TBEV infections result in characteristic neuropathological changes within the CNS. The brain is edematous and hyperemic. Typically, diffuse lymphocyte (and sometimes leukocyte) infiltrations are observed in cerebral and spinal meninges, with the most extensive area of meningitis being around the cerebellum. Microscopic lesions are particularly present in the medulla oblongata, pons, cerebellum (principally in Purkinje's cells), brainstem, basal ganglia, thalamus, and the spinal cord (mainly in anterior horn cells), but may be observed in almost all parts of the CNS. These lesions consist of lymphocytic perivascular infiltrations, accumulation of glial cells, necrosis of nerve cells, and neuronophagia. Infiltration and rarefaction of cells is also noted in the mesencephalon and diencephalon. In the cerebral cortex, changes including degeneration and necrosis of the pyramidal cells, lymphocytic accumulation, and glial proliferation, are restricted to the motor area [105, 159].

Direct infection of neurons is considered to be the major cause of TBE CNS pathology, since viral infections induce both apoptotic and necrotic neuronal cell death *in vivo* and *in vitro* [159-163]. While cytopathic effects are primarily observed in neurons, TBEV may also replicate in glial cells [161, 164]. However, pathologic changes in cells other than virus-infected neurons are presumably attributable to bystander injury. In addition to direct viral infection, the host immune response may significantly contribute to neuronal damage [161, 165] (see chapter 4.4.3).

4.4.3 Host immune response

The viremic phase of TBE commonly involves a significant decrease in the blood leukocyte count, thrombocytopenia, hyperalbuminorrachia, as well as elevated liver enzymes [166], and is accompanied by a pronounced lymphocytopenia in regional lymph nodes [167]. With the onset of CNS infection, cerebrospinal fluid (CSF) pleocytosis and transient blood leukocytosis are generally observed [105, 168]. Polymorphonuclear cells initially present in the CSF are almost completely replaced by mononuclear cells which are predominantly composed of CD4⁺ T lymphocytes, followed by CD8⁺ T lymphocytes, and a limited number of natural killer cells and B lymphocytes [105, 169]. The humoral immune response is reflected by an

increase of TBEV-specific antibodies of different isotypes in both serum and CSF. Whereas serum IgM activity rises between 0 and 6 days and declines 6 weeks after the beginning of neurological symptoms, CSF IgM levels peak between 9 days and 6 weeks after onset. In comparison, maximum IgG activity in both serum and CSF occurs after 6 weeks [170]. TBEV infections provide a level of immunity that prevents re-infection and thus confer life-long protection [171].

The role of cytokines and chemokines in the pathogenesis of TBE is poorly understood. However, elevated serum levels of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 α , and IL-6 are observed at the onset of neurological symptoms, with IL-1 α and TNF- α synergistically initiating the cascade of inflammatory mediators by targeting the endothelium [172]. IL-6 too acts as a pro-inflammatory mediator and may have neurotoxic effects in high concentrations. On the other hand, this cytokine mediates anti-inflammatory functions such as a negative regulation of TNF- α and, in association with soluble IL-6 receptor, the stimulation of neuronal survival and regeneration [172-174]. A decrease in serum levels of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 within the first week or so after the onset of neurological disease is accompanied by an increased level of IL-10. This anti-inflammatory mediator acts as an inhibitor of cytokine synthesis. An increase of soluble receptors of IL-1 (IL-1RA), TNF- α (sTNFRI), and IL-6 (sIL-6R) is observed within the same time period, with receptors presenting in the serum in a magnitude higher levels than the corresponding cytokines. The ratio of cytokines to their receptors significantly influences disease outcome, with increasing ratios of IL-1 to IL-1RA and TNF- α to sTNFRI having negative prognostic character [172]. In CSF, elevated concentrations of CCL2 (CC chemokine ligand 2), CCL5 (CC chemokine ligand 5), CXCL10 (C-X-C motif chemokine ligand 10), and sPECAM-1 (soluble platelet cell adhesion molecule-1) have been reported, suggesting a role of these molecules in the recruitment of leukocytes into the CSF [175-177]. Finally, in comparison with other viral meningitides, interferon γ is only presents at moderate CSF levels during TBE [178].

Although critical for controlling viral infections within the CNS, the host immune response may significantly contribute to the neuropathology of TBE. Prominent inflammatory infiltrates predominantly composed of T lymphocytes and macrophages topographically correlate with marked neuronal damage [179]. On the other hand, CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes may also be found in close contact with morphologically intact neurons, suggesting a key function of these cells in the

pathogenesis of encephalitis [159, 179]. In fact, CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes infiltrating the brain parenchyma have recently been confirmed to mediate immunopathology during TBE [180], most likely by initiating apoptotic cell death via the perforin and Fas/FasL pathways [181].

4.4.4 Clinical manifestations

Serological surveys suggest that 70 to 95 % of human TBEV infections in endemic regions are either sub-clinical or asymptomatic. However, TBEV may cause a variety of clinical symptoms which can be differentiated into distinct forms of TBE. While courses and symptoms are quite similar in the early stage of the disease, human infections with different subtypes of TBEV may, in a later stage, result in the development of clinical manifestations of variable severity. Regardless of disease severity, the incubation period is generally 7 to 14 days, with extremes ranging from 4 to 28 days. The onset of disease is characterized by fever, vomiting, headache, and muscular pains in the neck, shoulders, lower back, and limbs [17, 105].

Human infections with Far Eastern subtype viruses are typically characterized by a monophasic course of illness, with the initial symptoms directly proceeding to neurological dysfunctions. Patients frequently develop severe focal meningo-encephalitis or polyencephalitis accompanied by loss of consciousness and prolonged feelings of fatigue during recovery. Mild febrile forms are observed less frequently (14 to 16 %), and the case fatality rate is about 35 % (20 to 60 %). These high mortality figures may, however, be due to the lack of detection or reporting of mild cases. Whereas slow progressive forms of TBE are rare (less than 0.05%), long-term neurological consequences resulting from acute disease persist in about 75 % of all cases [1, 17, 182].

Siberian subtype TBE viruses induce a less severe acute period with a tendency for the patients to develop non-paralytic febrile forms of illness (about 80 %). Case fatality rates rarely exceed 6 to 8 %. However, there is an increased prevalence of chronic illnesses. Such disease forms result from extremely prolonged infections and may present as long-term sequelae (months or years) of any of the acute disease symptoms. Alternatively, chronic TBE may begin without typical acute manifestations, and the development of neurological symptoms can take years following infection through a tick bite. Clinical symptoms of chronic TBE include

Kozshevnikov's epilepsy, progressive neuritis of the shoulder plexus, lateral or dispersed sclerosis, progressive muscle atrophy, and a Parkinson-like disease. These symptoms are frequently accompanied by mental deterioration resulting in severe dementia or even death [17, 183].

In contrast to Far Eastern (3 to 8 %) and Siberian (21 %) subtype infections, the typical course of TBE caused by European subtype viruses is biphasic in 72 to 87 % of all patients [1, 17, 182]. The initial stage corresponds to the viremic phase and usually presents as an uncharacteristic, flu-like illness with symptoms such as fever (38 to 39°C), fatigue, headache, and muscular pains lasting for 2 to 4 days (maximum: 10 days). This phase is followed by a non-febrile and relatively asymptomatic interval of about one week (1 to 33 days). The beginning of the second stage is characterized by another significant increase in temperature, with peak values typically being 1 to 2°C higher than those of the first phase. This stage correlates with the virus invasion into the CNS and occurs in about 20 to 30 % of symptomatic infections [184]. The second phase clinically presents as meningitis in about 50 %, meningoencephalitis in about 40 %, and as meningoencephalomyelitis in about 10 % of the patients [155, 185].

The main symptoms of meningitis are high fever, headache, nausea, vomiting, and vertigo. Signs of meningeal irritation (spinal and nuchal rigidity, Brudzinski's and Kernig's signs) usually occur, but may not be pronounced. The fever lasts for 7 to 14 days with gradual but usually complete recovery [17, 105].

Meningoencephalitis is characterized by a disturbance of consciousness ranging from somnolence to stupor and, in rare cases, coma. In some patients, a rapid development of delirium and psychosis is observed. Meningoencephalitic symptoms include fibrillar contractions, bradycardia, bradykinesia, stomach bleeding, hyperkinesias, hemiparesis, and hemiplegia. Since cranial nerves (mainly of ocular, facial, and pharyngeal muscles) are frequently affected, nystagmus, asymmetric facial paresis, as well as swallowing and speech disorders are commonly observed [17, 186]. Fever associated with meningoencephalitis generally lasts for 4 to 10 days (maximum: 30 days), and convalescence is very slow. Sequelae such as nervous exhaustion, malaise, mood disorders, or hearing impairment may persist for several years [17, 187].

Meningoencephalomyelitis is the most severe form of the disease. It is typically characterized by a prodromal period with fatigue, periodic muscle contractions, and a sense of weakness or numbness in the limbs, which later develops as a paralytic disorder. Paresis intensifies during the first to the third day of the second febrile period, sometimes lasting up to 2 weeks, and occasionally for several months. By the end of the second or third week, muscles begin to atrophy [17]. Flaccid paresis usually affects the neck and upper extremity muscles. Proximal segments are more frequently involved than distal ones [186]. If the infection and neuronal damage spreads to the medulla oblongata and the central portions of the brainstem, bulbar syndrome may develop. Death usually occurs within 5 to 10 days after the onset of neurological signs, and is most commonly secondary to respiratory and circulatory failure or diffuse brain edema [105]. Only about half of the patients show very slow and partial recovery from the neurological injuries, and progressive deterioration is common following this form of disease [17]. A more favorable prognosis is associated with the development of TBE into a polyradiculoneuritic instead of the myelitic form [105].

In general, the case fatality rate is approximately 1 to 2 % following European subtype infections [12], and disease severity increases with the age of the patient [185]. Whereas severe forms (meningoencephalitis, meningoencephalomyelitis) occur in 46 to 86 % of patients of more than 30 years of age, meningitis is the predominant disease form in children and adolescents [187]. In contrast, infections with Far Eastern subtype viruses result in a more severe disease in children than in adults [17, 188].

4.4.5 Diagnosis, treatment, and prevention

Since clinical symptoms and laboratory findings observed with TBE are similar to other CNS diseases, differential diagnosis of TBEV infections has to be established in the laboratory [171]. Diagnostic evidence may rely on serological or molecular biological methods.

Serology-based techniques are most common today and can be used in the second phase of infection, when the virus has been cleared from the blood and neurological symptoms are manifest. Development of the humoral immune response (see chapter 4.4.3) enables diagnosis of TBE by detecting TBEV-specific IgM and

IgG antibodies using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) or neutralization tests (NT), amongst others [105, 187]. Although ELISA currently is the method of choice, correct interpretation is often complicated by a number of factors such as cross reactions with antibodies directed against other *flaviviruses*, past infections with TBEV, or recent vaccination [1, 189-190]. Since IgM antibodies induced during vaccination or natural infection may persist for up to 10 months, early diagnosis by detecting only IgM is questionable and should be confirmed by detection of IgG [105]. Verification of positive ELISA results using NT requires handling of infectious virus, wherefore such tests are only available in highly specialized laboratories.

Molecular techniques for TBEV detection are PCR-based and can be used in the viremic phase of the infection, allowing for an early diagnosis of TBE prior to the appearance of antibodies in serum and CSF [190]. These methods include reverse transcription (RT)-PCR, nested RT-PCR, and real-time RT-PCR, which are able to detect viral RNA in serum [190-191] and CSF samples [189, 191]. Furthermore, such techniques can be used for post-mortem confirmation of TBE in brain tissue samples [189-190, 192]. On the other hand, no virus can be detected in blood or CSF during the second phase of infection [193]. Since most patients come for medical attention at the beginning of this stage, when neurological symptoms are manifest, molecular methods are of limited value in routine diagnostics.

The establishment of a definite diagnosis has no influence on the therapy of TBE, since no specific curative treatment of this disease is known so far. Supportive treatment includes paracetamol, aspirin, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. In addition, clinical management of patients comprises strict bed rest until fever and neurological symptoms have subsided, the maintenance of water and electrolyte balances, the administration of vitamins, and sufficient caloric intake [38, 187]. The application of tetracyclines may reduce immunopathological effects in the CNS by inhibiting the synthesis of inflammatory mediators such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α [172].

TBE can efficiently be prevented by active vaccination. Currently, two licensed inactivated TBEV vaccines are available in Europe: the Austrian vaccine FMSE-Immun® (“0.5 ml” and “0.25 ml Junior”, Baxter AG, virus strain “Neudoerfl”) and the German vaccine Encepur® (“Adult” and “Children”, Novartis AG, virus strain “K23”). Furthermore, two Russian vaccines are manufactured in Tomsk (“EnceVir”,

MicroGen, virus strain “Sofjin”) and Moscow (Chumakov Institute of Poliomyelitis and viral Encephalitides, virus strain “205”) [194]. The European vaccines are effective between 95 to 99 % [195] and may also protect against infections caused by Far Eastern subtype viruses [194]. Basic immunization comprises three doses, with the second being administered 1 to 3 months after the first, and the third being administered 5 to 12 (FMSE-Immun®) or 9 to 12 (Encepur®) months after the second injection, respectively. In addition, booster inoculations are required every 10 years (as stated by the FOPH and the “Eidgenössische Kommission für Impffragen”) in order to maintain long-term immunity [196]. Although post-exposure administration of specific hyperimmunoglobulin possibly prevents TBE [1], it may as well exacerbate the disease through antibody-dependent enhancement of infection [185, 197-198]. Post-exposure prophylaxis is therefore highly questionable.

Besides vaccination, general preventive measures may decrease the risk of infection through tick bites. These include the avoidance of tick habitats if possible, the wearing of appropriate clothing (long trousers preferentially tucked into socks, shoes covering the entire foot), the use of tick repellents, and a regular checking of the skin for ticks [1]. With respect to the alimentary route of infection (see chapter 4.4.1), pasteurization of milk may further help to reduce the risk of exposure. Probably, risk avoidance through changing human behavior has contributed to a decreasing incidence of TBE infections in several countries [133].

5 AIMS OF THE THESIS

Despite the fact that TBEV is a serious cause of central nervous system disease with increasing morbidity in Switzerland, only very limited information on the endemicity of this pathogen has been available so far. Until now, disease risk assessment has been done by describing clinical cases and their geographic location. This approach, however, provides no information on the actual rate of TBEV infection of ticks. Likewise, the genetic and biological properties of the viruses circulating in Switzerland have not been characterized up to now. Therefore, the aims of this project were as follows:

- I) To establish and validate a high-throughput sample preparation and real-time RT-PCR method for the identification of TBEV in tick samples
- II) To assess the virus prevalence in *Ixodes ricinus* ticks collected in endemic and non-endemic areas throughout Switzerland
- III) To recover TBEV field isolates from tick samples using a mammalian cell culture system
- IV) To determine the genetic properties and phylogenetic classification of Swiss TBEV by analyses of the viral envelope gene sequence
- V) To characterize the isolates with respect to their virulence using an *in vitro* mammalian cell culture system and an *in vivo* mouse model of TBE

The knowledge gained from this study essentially contributes to an improved risk assessment of TBE in Switzerland and provides an important characterization of the basic properties of Swiss TBEV.

6 RESULTS

Here the results of this PhD thesis are presented in the form of an accepted publication and a submitted manuscript.

The publication ***“High-Throughput Procedure for Tick Surveys of Tick-Borne Encephalitis Virus and Its Application in a National Surveillance Study in Switzerland”*** comprises the approaches to aims I) to III) listed in chapter 5, whereas the manuscript ***“Phylogenetic and Virulence Analysis of Tick-Borne Encephalitis Virus Field Isolates from Switzerland”*** provides the findings with respect to aims IV) and V), respectively.

All aims specified in chapter 5 were successfully reached.

6.1 High-Throughput Procedure for Tick Surveys of Tick-Borne Encephalitis Virus and Its Application in a National Surveillance Study

Submitted to "Applied and Environmental Microbiology" on 12 February 2010

Accepted for publication on 29 April 2010

Appl Environ Microbiol, 2010. 76(13): 4241-4249

Rahel Gäumann¹, Kathrin Mühlemann¹, Marc Strasser², Christian M. Beuret^{2*}

¹Institute for Infectious Diseases, University of Bern, Friedbühlstrasse 51, 3010 Bern, Switzerland; ²Spiez Laboratory, Federal Office for Civil Protection, Austrasse, 3700 Spiez, Switzerland; *Correspondence: Phone: 41 (33) 228 16 64. Fax: 41 (33) 228 14 02. E-mail: christian.beuret@babs.admin.ch

Abstract	237 words
Text	5,978 words
Figures	1
Tables	7
References	44

High-Throughput Procedure for Tick Surveys of Tick-Borne Encephalitis Virus and Its Application in a National Surveillance Study in Switzerland[†]

Rahel Gäumann,¹ Kathrin Mühlemann,¹ Marc Strasser,² and Christian M. Beuret^{2*}

Institute for Infectious Diseases, University of Bern, Bern, Switzerland,¹ and Spiez Laboratory, Federal Office for Civil Protection, Spiez, Switzerland²

Received 12 February 2010/Accepted 29 April 2010

Tick-borne encephalitis (TBE), a viral infection of the central nervous system, is endemic in many Eurasian countries. In Switzerland, TBE risk areas have been characterized by geographic mapping of clinical cases. Since mass vaccination should significantly decrease the number of TBE cases, alternative methods for exposure risk assessment are required. We established a new PCR-based test for the detection of TBE virus (TBEV) in ticks. The protocol involves an automated, high-throughput nucleic acid extraction method (QIA-symphony SP system) and a one-step duplex real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) assay for the detection of European subtype TBEV, including an internal process control. High usability, reproducibility, and equivalent performance for virus concentrations down to 5×10^3 viral genome equivalents/ μ l favor the automated protocol compared to the modified guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction procedure. The real-time RT-PCR allows fast, sensitive (limit of detection, 10 RNA copies/ μ l), and specific (no false-positive test results for other TBEV subtypes, other flaviviruses, or other tick-transmitted pathogens) detection of European subtype TBEV. The new detection method was applied in a national surveillance study, in which 62,343 *Ixodes ricinus* ticks were screened for the presence of TBE virus. A total of 38 foci of endemicity could be identified, with a mean virus prevalence of 0.46%. The foci do not fully agree with those defined by disease mapping. Therefore, the proposed molecular test procedure constitutes a prerequisite for an appropriate TBE surveillance. Our data are a unique complement of human TBE disease case mapping in Switzerland.

Tick-borne encephalitis (TBE) is a zoonotic arbovirus infection of the central nervous system affecting humans (10). With approximately 3,000 cases annually in Europe and about 11,000 cases annually in Russia, it is the most important tick-borne viral disease of humans in Eurasia (17, 19). TBE is caused by the tick-borne encephalitis virus (TBEV), a member of the genus *Flavivirus* within the *Flaviviridae* family (18).

TBEV was first isolated in 1937 in far-eastern Russia (44). Based on the sequence of the envelope gene, the virus is taxonomically classified into European, Siberian, and Far Eastern subtypes (11). Whereas encephalitis caused by European subtype viruses is usually mild with a fatal outcome of 1 to 5% (14), Far Eastern strains cause severe encephalitis with a case fatality rate of 20 to 60%. Siberian subtype isolates produce a less severe disease, but with a tendency for development of chronic infections (16, 17).

TBEV is typically transmitted by tick bites. *Ixodes ricinus*, a three-host tick with larval, nymphal, and adult male or female stages, is known to be the principal vector of European subtype TBEV (30). Rarely, alimentary routes of transmission have been described (15). Ticks are infected chronically throughout their life cycle (17). In addition to this transstadial transmission, the virus is spread transovarially (6) or between ticks feeding on the same host (21). As they are more numerous

than adults, nymphs are thought to be the most important stage in the transmission of the virus (39).

Between 1990 and 2007, an increase of 317.8% in registered TBE cases in Europe was observed. This disease spread may have been favored by many factors, including climate change and social, political, ecological, economic, and demographic factors (40). As it was the case in many European countries, an increase in TBE morbidity was also observed in Switzerland and Germany, where the European subtype TBE virus was found to circulate within foci of endemicity limited to strict regions (2, 25, 42). Except for several studies focusing on restricted geographic areas (2, 43) the actual rate of TBEV infection of ticks in Switzerland is not known, and current Swiss distribution maps of TBEV are based on human disease cases (13). However, since mass vaccination programs have been introduced in Switzerland, alternative methods for predicting foci of endemicity are required.

Molecular biological methods are a convenient tool for studies of the prevalence of tick-borne pathogens. So far, however, such methods have not been standardized (8). Reverse transcription-PCR (RT-PCR) assays to detect TBEV RNA in ticks have been described previously (28, 33, 34, 36, 37, 43). Many of the described protocols exhibit unsatisfactory sensitivity and specificity (7) and do not include an internal process control (IPC) which would detect presumed inhibitors.

Likewise, numerous approaches for nucleic acid (NA) extraction from ticks using conventional precipitation or commercial purification kits based on silica gel or magnetic

* Corresponding author. Mailing address: Spiez Laboratory, Ausstrasse, 3700 Spiez, Switzerland. Phone: 41 (33) 228 16 64. Fax: 41 (33) 228 14 02. E-mail: christian.beuret@babs.admin.ch.

[†] Published ahead of print on 7 May 2010.

TABLE 1. Specificity of the one-step duplex real-time RT-PCR assay

Taxon	Strain (subtype) ^a	Source ^b	BSL ^c	PCR result ^d
<i>Tick-borne encephalitis virus</i>	Neudörfl (E), NCPV 364	2	3	+
	Absettarov (E), NCPV 344	2	3	+
	Hypr (E)	1	3	+
	Hanzalova (E)	1	3	+
	Soukup (E)	1	3	+
	Isolate 43 (E)	1	3	+
	Isolate 94 (E)	1	3	+
	Isolate 117 (E)	1	3	+
	Isolate 465 (E)	1	3	+
	Isolate 8641 (E)	1	3	+
	Aina (S)	1	4	ns
	Vasilchenko (S)	1	4	ns
	Sofjin (FE)	1	4	—
<i>Louping ill virus</i>	NCPV 212	1	3	—
<i>Powassan virus</i>		1	3	—
<i>Eyach virus</i>		1	2	—
<i>Tribec virus</i>		1	2	—
<i>Tahyna virus</i>		1	2	—
<i>Uukuniemi virus</i>		1	2	—
<i>Dengue virus 1</i>	TC 974, NCPV 670	2	3	—
<i>Dengue virus 2</i>	New Guinea, NCPV 151	2	3	—
<i>Dengue virus 3</i>	H 87, NCPV 153	2	3	—
<i>Dengue virus 4</i>	H 241, NCPV 152	2	3	—
<i>Yellow fever virus</i>	17 D, NCPV 507	2	2	—
<i>West Nile virus</i>	NY 99, NCPV 398	2	3	—
<i>Japanese encephalitis virus</i>	Nakayama, NCPV 502	2	3	—
<i>St. Louis encephalitis virus 1</i>	NCPV 052	2	3	—
<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>		3	2	—
<i>Borrelia afzelii</i>		3	2	—
<i>Borrelia bissettii</i>		3	2	—
<i>Borrelia garinii</i>		3	2	—
<i>Borrelia spielmanii</i>		3	2	—
<i>Borrelia valaisiana</i>		3	2	—
<i>Rickettsia helvetica</i>		4	3	—
<i>Rickettsia slovaca</i>		4	—	—
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>		8	3	—
<i>Babesia divergens</i>		5	2	—
<i>Babesia microti</i>		5	2	—
<i>Mengovirus</i>	vMC ₀	7		+
<i>Enterovirus 71</i>		6	2	—
<i>Polio virus type 1</i>	NCPV 140	2	2	—

^a E, European; S, Siberian; FE, Far Eastern.

^b 1, Daniel Růžek, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic; 2, NCPV, Wiltshire, United Kingdom; 3, Lise Gern, University of Neuchâtel, Switzerland; 4, Olivier Péter, Institut Central des Hôpitaux Valaisans ICHV, Sion, Switzerland; 5, Bruno Gottstein, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Switzerland; 6, Kathrin Mühlemann, University of Bern, Switzerland; 7, Maria Isabel Costafreda, University of Barcelona, Spain; 8, National Collection of Type Cultures (NCTC), Colindale, United Kingdom.

^c BSL, biosafety level (classification according to the Swiss Agency for the Environment, Forests and Landscape).

^d +, positive test result; —, negative test result; ns, nonsignificant (reaction efficiency of <0.18).

particle technology (2, 5, 38, 43) have been described. In addition, sample preparations using Chelex resin have been specified, allowing (RT-)PCR detection of pathogens without NA purification (33). However, most of these protocols describe a single-tube assay not suitable for large-scale surveillance studies.

As the endemicity of TBEV in Switzerland is largely unknown, we intended to perform a national screening of ticks for the presence of this virus using a high-throughput method. Thus, the aims of the present study were as follows: first, to develop and validate a one-step duplex real-time RT-PCR system for the specific detection of European subtype TBEV in ticks, including an internal process control; second, to establish and evaluate an automated high-throughput nucleic acid extraction method using the magnetic particle-based QIA-

symphony SP system (Qiagen); and third, to assess the TBEV prevalence in ticks collected in areas of Switzerland of potential endemicity and in areas where the virus is not endemic.

MATERIALS AND METHODS

Viral strains and cell culture conditions. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) strains used for real-time RT-PCR and sample preparation method development were kindly provided by Daniel Růžek (University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic) or were acquired from the National Collection of Pathogenic Viruses (NCPV) (Wiltshire, United Kingdom) (Table 1). Viral strains classified as biosafety level 4 pathogens (as defined by the Swiss Agency for the Environment, Forests and Landscape) were supplied in an inactivated form. We used the porcine kidney stable (PS) cell line for the propagation of all TBEV strains and other viruses of the TBEV complex. The cell line was maintained in L-15 medium (Leibowitz, Biochrom AG, Berlin, Germany) supplemented with 1% glutamine, 5% fetal calf serum, 1% penicillin-streptomycin,

and 0.5% neomycin. Cells were cultured in 25-cm² Corning culture flasks (Sigma-Aldrich, Basel, Switzerland) at 37°C. Thirty minutes before inoculation, the culture medium of PS cell monolayers was renewed with 2.5 ml of fresh medium. Subsequently, cells were inoculated with 100 µl of either virus culture supernatant or tick homogenate and incubated for 1 h at room temperature. At 1 h postinfection, we added 12.5 ml of culture medium to a total volume of 15 ml, and cultures were incubated for 6 days at 37°C.

We used an avirulent-phenotype mutant strain of the infectious mengovirus (vMC₀; *Cardiovirus*, *Picornaviridae*) (9, 23) as an internal process control (IPC); the plasmid pMC₀ and the virus derived from it were kindly provided by Maria Isabel Costafreda (University of Barcelona, Spain). The virus was propagated in HeLa cell cultures (ATCC CCL-2) as described before (9, 23). Cell cultures showing a cytopathic effect of 75% were frozen and thawed once and diluted in Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) without Ca²⁺ and Mg²⁺ (D-PBS) (Biochrom AG) to yield a concentration of 5×10^6 viral genome equivalents/ml. Aliquots were stored at -80°C for further use as IPC.

Primer and probe design. The specific primers and hydrolysis probes for the detection of the European subtype TBEV (envelope gene; 5'-FAM and 3'-BHQ-1) and mengovirus mutant strain vMC₀ (5'-noncoding region; 5'-JOE and 3'-BHQ-1) were designed using Primer Express software v3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) and purchased from Microsynth (Balgach, Switzerland).

RNA standards. Two RNA standards were generated for the validation of both the TBEV- and the mengovirus vMC₀-specific real-time RT-PCRs. Restriction enzyme digestion, cloning, subcloning, and DNA electrophoresis were done using standard techniques (35). Specific cDNA sequences were synthesized and PCRs were performed using Herculase II Fusion DNA polymerase (Stratagene, Zurich, Switzerland). The synthetic fragments were digested with 5' EcoRI and 3' SalI and ligated into a pGEM3zf3p cloning vector (Promega, Madison, WI) using T4 DNA ligase (New England Biolabs, Bioconcept, Alschwil, Germany). TOP10 *Escherichia coli* (One Shot Top10 Electrocomp *E. coli*; Invitrogen Life Technologies, Basel, Switzerland) was transformed by electroporation. Plasmid DNA was prepared with the Qiagen plasmid maxi kit (Qiagen, Düsseldorf, Germany) and linearized with the restriction enzymes SalI and XbaI. Two micrograms of the linearized DNA was gel purified with the QIAquick gel extraction kit (Qiagen) and used for *in vitro* transcription with a riboprobe *in vitro* transcription system with T7 RNA polymerase (Promega). The resulting RNA was purified using NucAway spin columns (Applied Biosystems/Ambion, Rotkreuz, Switzerland). All steps were performed by Solvias (Basel, Switzerland). The copy numbers of the standard RNAs were calculated using the Mongo Oligo mass calculator v2.06 (Jef Rozenski, University of Utah).

One-step real-time RT-PCR and cycling conditions. Single and duplex one-step real-time RT-PCRs were performed using the QuantiFast probe RT-PCR kit (Qiagen). The real-time RT-PCR conditions were as follows: 12.5 µl of 2× QuantiFast probe RT-PCR master mix, 0.25 µl of QuantiFast RT mix, 2 µl of each primer stock (10 µM), 0.5 µl of the probe stock (10 µM), 2 µl of sample, and RNase-free water to adjust the volume to 25 µl. Pipetting was performed with the CAS-1200 liquid-handling system (CAS Robotics 4 version 4.7.98 software; Corbett Robotics Pty Ltd., Queensland, Australia) into 96-well Twin.tec real-time PCR plates (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Plates were sealed with a 230-V heat sealer (Eppendorf), and amplification was performed using a Mastercycler ep realplex S (Eppendorf). The cycling conditions for the amplification were as follows: reverse transcription at 50°C for 10 min, an initial PCR activation step at 95°C for 5 min, and 45 cycles of two-step cycling for 10 s at 95°C and 30 s at 60°C.

Real-time RT-PCR specificity. To confirm the specific detection of European subtype TBEV as well as mengovirus vMC₀ in the duplex assay, we tested a total of 40 microorganisms, including other flaviviruses, other tick-transmitted pathogens, and two members of the *Picornaviridae* family (Table 1).

Real-time RT-PCR sensitivity. The limit of detection (LOD) is defined as the minimal amount of standard RNA that can be detected with a probability of 95%. We prepared 20× 10 and 20 copies/µl of TBEV and vMC₀ standard RNAs diluted in Tris-EDTA buffer solution (Sigma-Aldrich) to identify the LOD of the RT-PCR.

Real-time RT-PCR efficiency, linearity, and effective range. The linearity of the real-time RT-PCR was determined by assaying 10 replicates of Tris-EDTA buffer solution spiked with 10-fold dilutions of standard RNA ranging from 10¹ to 10⁷ copies/µl. A standard curve (linear regression) was calculated based on the mean quantification cycle (C_q) values. Amplification efficiency was calculated from the log-linear portion of the standard curve using the equation efficiency = 10^{-1/slope} - 1.

Real-time RT-PCR accuracy and precision. The accuracy of the duplex real-time RT-PCR was defined as the percentage of false-positive and false-negative results. We analyzed Tris-EDTA buffer solution (Sigma Aldrich) spiked with 0

(known true-negative sample), 10, 20, and 50 copies/µl of the TBEV and mengovirus vMC₀ standard RNAs. At the same time, the recovery rates were determined using samples spiked with 100, 1,000, and 10,000 copies/µl. The assay was repeated four times, with each concentration in five replicates. The recovery rates, in percent, were calculated as the assessed copy number divided by the spiked copy number multiplied by 100. Interassay precision (reproducibility), which indicates the variability between different runs, was assessed by analyzing five replicates of 100, 1,000, and 10,000 standard RNA copies/µl in four independent experiments. Intra-assay precision (repeatability), defining variability within the same run, was determined by simultaneously assaying dilution series of 10 replicates with 100, 1,000, and 10,000 standard RNA copies/µl.

Homogenization of ticks. Tick samples were prepared from frozen tick pools of 10 nymphs or 5 adult female or male ticks. Six hundred microliters of buffer solution kept at 4°C (see "Optimization of the automated nucleic acid extraction" below) was added to each frozen tick pool. Samples were immediately homogenized using the TissueLyser system (Qiagen). One 3-mm tungsten carbide bead (Qiagen) was added to each tube (collection microtubes; Qiagen), and tick pools were homogenized for 4 min at 30 Hz. After a short centrifugation step (5 s at 3,220 × g), the supernatants were collected in separate collection microtubes for further use.

Automated nucleic acid extraction using the QIASymphony SP system. We performed automated nucleic acid (NA) extraction using the QIASymphony SP system (Qiagen). For this purpose, 200 µl of tick homogenate supernatant or cell culture supernatant was inactivated in 800 µl of AVL viral lysis buffer (Qiagen). The AVL buffer was supplemented with 3 µg of carrier RNA (Qiagen) and a defined amount of the IPC mengovirus vMC₀ (10⁴ viral genome equivalents/sample). NA extraction was performed using the QIASymphony Virus/Bacteria Midi kit (Qiagen) and a specially adapted protocol (CP Complex 920 FIX v1; Qiagen). RNA was eluted in a final volume of 60 µl and either directly used for downstream applications or stored at -80°C for further use.

Manual total RNA extraction procedure. The efficiency of the automated NA purification was compared to that of a modified guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction procedure (4) with Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies), which was performed according to the manufacturer's instructions.

Comparison of the manual and the automated nucleic acid extraction procedures. To compare the efficiencies of the automated and the manual NA extractions, various samples were prepared and processed using both methods. In all experiments, we added 5×10^3 viral genome equivalents of IPC (mengovirus vMC₀) to each sample prior to the NA extraction procedure. Viral genome equivalents were defined by real time RT-PCR analysis using quantified standard RNA. Pools of 10 laboratory-bred *Ixodes ricinus* nymphal ticks (kindly provided by Daniel Růžek) were homogenized in 600 µl of D-PBS and spiked with serial dilutions of TBE virus strain Hypr (GenBank accession no. U39292) (27) ranging from 5×10^5 to 5×10^2 viral genome equivalents/µl. In parallel, we prepared serial dilutions ranging from 5×10^4 to 50 viral genome equivalents/µl in pure D-PBS solution in order to exclude any matrix effects. Each virus dilution was done in four, replicates and the experiment was repeated on three days. Samples were extracted using both the QIASymphony SP system and the modified guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform protocol, and the RNA recovery rates were compared.

Optimization of the automated nucleic acid extraction. To optimize the NA recovery using the QIASymphony SP system, four different D-PBS solutions were compared for homogenization of laboratory-bred ticks. We compared the standard procedure using pure D-PBS to protocols using D-PBS supplemented either with InhibitEX tablets (one tablet in 20 ml of buffer; Qiagen), with Complete protease inhibitor cocktail mini tablets (one tablet in 10 ml of buffer; Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland), or with bovine serum albumin (BSA) (100 µg/ml; Sigma-Aldrich). Homogenates were spiked with serial dilutions of TBEV (strain Hypr) ranging from 5×10^5 to 5×10^2 viral genome equivalents/µl, and RNA was extracted using the QIASymphony SP system. In parallel, we spiked serial dilutions ranging from 5×10^4 to 50 viral genome equivalents/µl into pure solutions (not containing any tick cell debris) in order to exclude any matrix effects. Each sample extraction was performed in duplicate, and the experiment was repeated three times. We compared the RNA recovery rates and selected an optimal homogenization buffer.

Comparison of the manual and the optimized automated procedures for the analysis of naturally infected ticks. Both the optimized automated NA purification protocol and the manual total RNA extraction procedure were finally applied to a total of 162 pooled tick samples (257 adults and 960 nymphs). We collected these ticks in a known area of TBE endemicity of Switzerland. Ticks were homogenized in D-PBS supplemented with InhibitEX at a concentration of one tablet/20 ml as described above. Two hundred microliters of each sample was

TABLE 2. One-step real-time RT-PCR primers and hydrolysis probes specific to European subtype TBEV and IPC mengovirus vMC₀

Target and description	Primer name	Sequence (5' → 3')	Position on gene ^a	Product size (bp)
TBEV <i>E</i> gene				
Forward	TBEE-F6	GGCTTGTGAGGCCAAAAAAGAA	1329–1349	87
Reverse	TBEE-R2	TCCCGTGTGTGGTTCGACTT	1397–1416	
Probe	TBEE-P4	FAM-AAGCCACAGGACATGTGTACGACGCC-BHQ-1	1349–1374	
Mengovirus vMC ₀ 5' noncoding region				
Forward	Mengo-F1	GACTACCCACTCCCCCTTTC	64–84	103
Reverse	Mengo-R1	GCTTCGGCCAGTAATGTGAT	147–167	
Probe	Mengo-P1	JOE-TGAAGGCTACGATAGTGCCAGGGC-BHQ-1	88–112	

^a For the TBEV *E* gene, positions of genes are according to accession number U27495.1. For the mengovirus vMC₀ 5' noncoding region, positions are according to <http://virology.wisc.edu/acp/Plasmids/PlasmidFiles/pMC0.gb.txt>.

used for NA purification with the QIAAsymphony SP system, and 100 µl was used for the manual total RNA extraction procedure. We also added 5×10^3 viral genome equivalents of IPC (mengovirus vMC₀) to each sample. After extraction, viral RNA was quantified using the one-step duplex real-time RT-PCR assay.

Exclusion of inhibitory or toxic effects of InhibitEX on TBEV propagation in PS cells. Since TBEV-PCR-positive tick homogenates will be applied to cell culture in order to isolate and propagate viable viruses, any toxic or inhibitory effect of the D-PBS homogenization buffer solution supplemented with InhibitEX had to be excluded. Therefore, PS cell monolayers (cultured in 25-cm² Corning culture flasks [Sigma-Aldrich]) were supplemented with 100, 200, or 1,000 µl of InhibitEX solution (one tablet/20 ml of D-PBS) and inoculated with TBE virus (strain Hypr) as described above, with each approach performed in triplicate. The cell cultures were incubated at 37°C for 4 days. To monitor virus propagation, we extracted RNA using the QIAAsymphony SP system and quantified the viral load by one-step real-time RT-PCR every day.

Tick sampling. The required sample size for estimating the TBEV prevalence in a cross-sectional study was calculated using the formula $n = [(1.96 \times SD)/L]^2$, with SD being the standard deviation of the expected prevalence and L being the desired precision. With an expected virus prevalence of 0.5% (10, 25, 31), 765 ticks have to be analyzed in order to obtain a prevalence estimate with a 95% level of confidence (CL) and a precision of $\pm 0.50\%$. On average, about 400 ticks were collected in one area. This sample size allows for a prevalence estimation with a 95% CL and a precision of $\pm 0.70\%$ ($n = 390$) if the prevalence turns out to be the expected value of 0.5%. A total of 62,343 questing ticks were collected at 165 collection sites throughout Switzerland by flagging low vegetation. Ticks were randomly identified based on morphological characteristics and immediately stored at -80°C . Subsequently, ticks were washed once in 75% alcohol and twice in deionized water, dried on paper towels, and sorted into pools of 10 nymphs or 5 adult male or female ticks. Pooled samples were stored at -80°C until further processing. The biostatistical rationale of pooling has been described elsewhere (1).

Screening for the presence of European subtype TBEV in ticks. Tick pools were screened for the presence of European subtype TBEV using the optimized automated NA extraction protocol and the established one-step duplex real-time RT-PCR assay (including IPC). The resulting data show an estimate of the TBEV prevalence in ticks for the 165 collection sites in Switzerland. For all samples giving a TBEV-positive PCR test result, we performed virus isolation experiments as described above.

Data analysis. We calculated the one-step duplex real-time RT-PCR efficiencies using the LinRegPCR software version 11.5.0.0 (29). Efficiencies and Cq values of real-time RT-PCRs were compared by two-way analysis of variance (ANOVA) using the software GraphPad Prism version 4.0. (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA); a P value of <0.05 was regarded as significant. To compare the virus propagations in cell cultures treated with different concentrations of InhibitEX solution we performed a one-way ANOVA, and a P value of <0.05 was regarded as significant. Maximum-likelihood estimators of TBEV prevalence at each collection site were calculated using an online calculation tool of the Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Diseases (<http://www.abccrc.org.au>). The tool uses a generalized linear model to calculate the maximum-likelihood estimate and confidence limits of the estimated prevalence for variable pool sizes, assuming perfect test sensitivity and specificity (12). Stage-specific prevalences were calculated according to the formula $r = 1 - (1 - X_p/n_p)^{1/c}$ with r being the estimated prevalence, X_p being the

number of test-positive pools, n_p being the number of analyzed pools, and c being the pool size.

RESULTS

Robustness of the real-time RT-PCR. The one-step duplex real-time RT-PCR appeared to be highly robust. An elongation of the reverse transcription step to 20 or 30 min and use of various primer concentrations (0.4 to 1.0 µM) did not improve the results of the assay (data not shown). Performing the one-step duplex reaction using the QuantiTect multiplex RT-PCR kit (Qiagen) instead of the QuantiFast probe RT-PCR kit yielded slightly inferior reaction efficiencies and somewhat higher Cq values, mainly for low RNA concentrations (50 and 500 copies/µl) (data not shown).

Analytical specificity of the one-step duplex real-time RT-PCR assay. The primers and hydrolysis probes used in the one-step duplex real-time RT-PCR assay are listed in Table 2. All European subtype TBEV isolates were successfully detected (mean reaction efficiency, 0.815). Minor, nonsignificant reactions with TBEV Vasilchenko and TBEV Aina (both Siberian subtype) were recorded, with reaction efficiencies of 0.053 and 0.178, respectively (data not shown). We did not observe any nonspecific amplification of all tested flaviviruses, other tick-transmitted bacteria and parasites, or members of the genus *Picornaviridae* (Table 1).

Analytical sensitivity of the real-time RT-PCR assay. The LOD of the one-step duplex real-time RT-PCR assay is 10 standard RNA copies/µl for the detection of both TBEV and the IPC.

Real-time RT-PCR efficiency, linearity, and effective range. The assay was linear over the range of 10^1 to 10^7 copies/µl. The fitted linear model for TBEV quantification had a correlation coefficient (r^2) of 0.9997, with a P value of 2.46×10^{-10} . The regression analysis for quantification of mengovirus vMC₀ was slightly inferior, with a P value of 1.444×10^{-7} and an r^2 of 0.9966. The estimated efficiencies were 0.97 for the TBEV-specific reaction and 0.92 for the mengovirus-specific reaction.

Real-time RT-PCR accuracy and precision. The false-positive and false-negative rates of the assay are 0%. The recovery rates for 100, 1,000, and 10,000 standard RNA copies/µl are given in Table 3. The data on reproducibility and repeatability of the one-step duplex real-time RT-PCR are summarized in Table 4.

TABLE 3. Recovery rates of the one-step duplex real-time RT-PCR

Target and copies/ μl^a	Recovery rate (%)	CV (%) ^b
TBEV <i>E</i> gene		
100	169.80	19.59
1000	160.45	18.59
10,000	139.04	17.54
Mengovirus vMC ₀ 5' noncoding region		
100	221.06	23.79
1000	177.72	27.39
10,000	180.78	28.45

^a Number of copies of TBEV or IPC mengovirus vMC₀ standard RNA.^b Calculated on the basis of assessed copy numbers.

Comparison of the manual and automated nucleic acid extraction procedures. Analyzing buffer samples spiked with 5×10^4 to 50 viral genome equivalents/ μl , we did not observe any significant difference between the two NA extraction protocols ($P > 0.05$, Bonferroni posttest following two-way ANOVA). On the other hand, the precipitation method showed a higher RNA recovery for tick samples spiked with 5×10^3 and 5×10^2 TBE viral genome equivalents/ μl ($P < 0.001$, comparison of Cq values using Bonferroni posttest following two-way ANOVA) (Tables 5 and 6). PCR efficiency was not significantly influenced by the RNA purification protocol or by the amount of spiked TBEV ($P > 0.05$ for all pairwise comparisons, Bonferroni posttest following two-way ANOVA) (data not shown).

Optimization of the automated nucleic acid extraction. To optimize the automated NA extraction protocol, we compared the RNA recovery rates with the precipitation method and the automated NA extraction protocol (QIA Symphony SP system) for tick homogenates and pure matrix samples spiked with serial dilutions of TBE virus (strain Hypr). While Complete protease inhibitor cocktail mini tablets (Invitrogen Life Technologies) and BSA did not enhance the automated NA extraction (data not shown), RNA recovery from tick homogenates was improved by supplementing D-PBS-buffer with InhibitEX. Thereby, a level of sensitivity equivalent to that of the precipitation method (down to 5×10^3 viral genome equivalents/ μl) could be attained (Tables 5 and 6). For pure InhibitEX–D-PBS solutions, the performance of the optimized extraction protocol was significantly improved compared to that of the precipitation method for buffer samples spiked with 5×10^4 , 5×10^3 , and 50 TBE viral genome equivalents/ μl . While improving RNA extraction efficiency, however, InhibitEX did not enhance PCR efficiency compared to the precipitation method and the standard automated protocol ($P > 0.05$ for all pairwise comparisons, Bonferroni posttest following two-way ANOVA) (data not shown). IPC mengovirus vMC₀ RNA was successfully extracted using all protocols, excluding inhibition during the process of NA extraction (data not shown).

Comparison of the manual and optimized automated procedures for the analysis of naturally infected ticks. One of the 162 investigated pooled samples tested positive for TBEV with a viral load of 5×10^5 viral genome equivalents/ μl and could clearly be identified using both methods. However, the precip-

TABLE 4. Precision of the one-step duplex real-time RT-PCR

Target and copies/ μl^a	CV (%) ^b	
	Intra-assay precision	Interassay precision
TBEV <i>E</i> gene		
100	25.40	35.05
1000	9.16	36.65
10,000	17.11	29.89
Mengovirus vMC ₀ 5' noncoding region		
100	37.99	41.18
1000	24.83	41.47
10,000	26.35	37.61

^a Number of copies of TBEV or IPC mengovirus vMC₀ standard RNA.^b Calculated on the basis of assessed copy numbers.

itation method yielded a total of 11 questionable results (confirmed to be TBEV-negative by gel electrophoresis [data not shown]). Furthermore, the automated system provided much more reproducible results than the precipitation procedure (coefficient of variation [CV] for IPC quantification of 3.7% for the automated system versus 19% for the precipitation method [data not shown]).

Exclusion of inhibitory effects of InhibitEX on TBEV propagation in PS cells. One-way ANOVA revealed no significant difference ($P = 0.4175$) in virus propagation in cultures treated with different concentrations of InhibitEX (i.e., 0, 100, 200, and 1,000 μl of InhibitEX solution) (data not shown).

Screening for the presence of European subtype TBEV in ticks. A total of 62,343 questing ticks were screened for TBE virus presence. The IPC was successfully detected in all samples, excluding false-negative test results due to inhibition. Among the 165 collection sites, TBEV was found to be endemic in 38, with a mean estimated prevalence of 0.46% (Table 7; Fig. 1). The overall mean virus prevalence was higher in female (1.21%) and male (0.74%) adults than in nymphal ticks (0.20%). Virus isolates from 63 out of the 71 PCR-positive samples could successfully be amplified on cell culture. Eight isolates did not proliferate but were detectable by real-time RT-PCR in the virus culture supernatant at unvarying low concentrations throughout the incubation period.

DISCUSSION

Despite the necessity for tick surveys in national TBE surveillance systems, no standardized tool for this purpose has been available so far (8). Here we present a validated PCR-based, high-throughput analysis system for the detection of TBE viruses in ticks. Its application in a cross-sectional national surveillance study proved the validity and efficiency of the novel procedure.

High specificity of the one-step duplex real-time RT-PCR assay was achieved by designing primers and hydrolysis probes hybridizing with subtype-specific positions of the envelope gene. Interestingly, a primer and probe combination with a one-base overlap between the forward primer and probe allowed the most sensitive and specific detection of European subtype TBEV (Table 2). A U.S. patent published in 2008 (22) also describes an overlapping primer and probe yielding an

TABLE 5. Cq values and SDs of TBEV RNA quantification following NA extraction using different protocols

Sample type and amt (viral genome equivalents/ μ l) of spiked TBEV	Precipitation		QIASymphony SP system		QIASymphony SP system with InhibitEX	
	Mean Cq ^a	SD	Mean Cq ^b	SD	Mean Cq ^b	SD
Buffer samples						
5 $\times$ 10 ⁴	23.47	2.25	22.49	2.25	20.22	0.63
5 $\times$ 10 ³	26.77	1.52	26.65	1.31	23.80	0.85
5 $\times$ 10 ²	30.48	1.67	30.11	1.45	27.94	0.82
5 $\times$ 10 ¹	34.64	2.59	34.47	— ^c	31.41	1.31
Tick homogenates						
5 $\times$ 10 ⁵	20.52	0.96	20.90	1.10	20.35	0.64
5 $\times$ 10 ⁴	24.28	1.28	25.36	1.33	23.75	0.57
5 $\times$ 10 ³	26.51	1.88	29.00	1.33	27.13	0.41
5 $\times$ 10 ²	28.63	3.49	31.25	1.15	30.92	1.10

^a *n* = 24 measurements.

^b *n* = 12 measurements.

^c There was only one valid measurement.

efficient PCR. Although minor and particularly inefficient reactions with two Siberian subtype strains of TBEV were recorded, the specificity of the assay was confirmed by negative test results when assaying other flaviviruses as well as other tick-transmitted bacteria and parasites.

LODs of TBEV-specific RT-PCRs have previously been evaluated by assaying serial dilutions of mouse brain suspensions (34) or by preparing serial dilutions of *in vitro* transcripts of a cloned TBEV fragment (37, 43). We validated the analytical sensitivity but also other key issues of our one-step duplex real-time RT-PCR assay, i.e., the efficiency, linearity, effective range, accuracy, and precision, using self-constructed RNA standards. These quality criteria are a prerequisite to evaluate the performance of the real-time RT-PCR assay and thus to improve the interpretation of test results. Given that the TBEV concentration per infected tick lies between 10² and 10⁸ PFU, with a mean virus concentration below 10³ PFU (20), an LOD of 10 RNA copies/ μ l guarantees reliable detection of TBEV-positive ticks. However, the overestimated recovery rates obtained for the quantification of TBEV (between

139.04% and 169.80%) should be addressed by estimating the effective TBEV concentration in a tick sample.

Inhibitors are known to be present in many environmental samples and to hamper the interpretation of test results. Therefore, the addition of an internal process control at the sample preparation step is mandatory in order to monitor the presence of inhibitory substances and thus to prevent false-negative test results. Whereas most of the described TBEV-specific RT-PCR protocols do not include an IPC (28, 34, 36), the method described here allows the simultaneous quantification of European subtype TBEV and IPC mengovirus vMC₀ RNA.

A special emphasis should be placed on the benefit of simultaneously extracting both RNA and DNA from tick samples using the Virus/Bacteria Midi kit (Qiagen), which enables the monitoring of any tick-borne pathogen of interest (3, 41). This is a clear advantage over protocols which, though automated, do not simultaneously extract both DNA and RNA (24) or procedures which, while purifying both RNA and DNA, constitute single-tube approaches (5).

We compared the RNA extraction efficiency of a standard protocol using the QIASymphony SP system based on magnetic particle technology to that of the modified guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction procedure (4) using Trizol reagent. Whereas both protocols showed similar extraction efficiencies for spiked buffer samples, larger amounts of RNA (as concluded from lower Cq values) were recovered from tick samples using the precipitation method (Tables 5 and 6). The lower RNA recovery from tick samples could be explained by the presence of tick residues that could impair binding of NAs to the magnetic particle in the QIASymphony protocol. These inhibitory effects can be reduced by addition of counteracting substances. Guanidinium thiocyanate, for instance, as a component of lysis buffers, inhibits RNA-degrading enzymes by its chaotropic effect. The performance of experiments involving virus amplification from tick homogenates as a sideline of the proposed analysis system, however, prohibits the application of such cell-toxic substances in the homogenization step. As an alternative, protocols with nontoxic substances such as InhibitEX (Qiagen) were considered. Inhibi-

TABLE 6. *P* values of Bonferroni posttests comparing Cq values of TBEV RNA quantification following RNA extraction using different protocols

Sample type and amt (viral genome equivalents/ μ l) of spiked TBEV	<i>P</i> value		
	Precipitation vs QIASymphony SP system	Precipitation vs QIASymphony SP system with InhibitEX	QIASymphony SP system vs QIASymphony SP system with InhibitEX
Buffer samples			
5 $\times$ 10 ⁴	NS ^a	<0.01	NS
5 $\times$ 10 ³	NS	<0.05	NS
5 $\times$ 10 ²	NS	NS	NS
5 $\times$ 10 ¹	NS	<0.01	NS
Tick homogenates			
5 $\times$ 10 ⁵	NS	NS	NS
5 $\times$ 10 ⁴	NS	NS	<0.05
5 $\times$ 10 ³	<0.001	NS	<0.05
5 $\times$ 10 ²	<0.001	<0.01	NS

^a NS, nonsignificant.

TABLE 7. Maximum-likelihood estimators of TBEV prevalence in areas of endemicity in Switzerland^a

Commune (canton) ^b	Altitude (m above sea level)	Sample size ^c	Prevalence (%)	95% CL (%)	
				Lower	Upper
Zofingen (AG)	575	457	0.44	0.07	1.35
Brittnau (AG)	540	455	1.09	0.39	2.34
Gipf-Oberfrick (AG)	410	446	0.22	0.01	0.95
Belp (BE)	520	467	0.21	0.01	0.93
Reichenbach i.K. (BE)	720	384	0.52	0.09	1.6
Erlenbach i.S. (BE)	715	449	0.90	0.28	2.08
Thun (BE)	590	332	0.30	0.02	1.31
Spiez, Rustwald (BE)	660	462	0.43	0.07	1.33
Dagmarsellen (LU)	540	545	0.54	0.13	1.4
Ebikon (LU)	440	441	0.23	0.01	0.99
Alpnach (OW)	455	384	0.26	0.01	1.13
Mörschwil (SG)	525	523	0.38	0.06	1.17
Stein am Rhein (SH)	525	526	0.19	0.01	0.82
Oensingen (SO)	525	561	0.53	0.13	1.38
Gersau (SZ)	465	546	0.18	0.01	0.8
Freienbach (SZ)	415	434	0.44	0.07	1.36
Wängi (TG)	530	721	0.85	0.34	1.71
Frauenfeld (TG)	450	451	0.22	0.01	0.96
Lommis (TG)	680	678	0.45	0.11	1.15
Aadorf (TG)	530	533	0.19	0.01	0.82
Thundorf (TG)	620	504	0.19	0.01	0.85
Silenen (UR)	620	358	0.28	0.02	1.21
Sisikon (UR)	530	430	0.47	0.08	1.45
Schattdorf (UR)	410	411	0.49	0.08	1.49
Rances (VD)	610	555	0.36	0.06	1.10
Cudrefin (VD)	430	50	1.89	0.11	8.05
Salgesch (VS)	570	135	0.8	0.05	3.46
Raron (VS)	640	466	0.21	0.01	0.93
Steinhausen (ZG)	485	474	0.85	0.26	1.96
Unterengstringen (ZH)	470	599	0.17	0.01	0.73
Aeugst am Albis (ZH)	675	430	0.45	0.08	1.39
Langnau am Albis (ZH)	890	411	0.47	0.08	1.44
Elgg (ZH)	710	712	0.14	0.01	0.62
Bassersdorf (ZH)	470	723	0.28	0.05	0.85
Rümlang (ZH)	490	417	0.23	0.01	1.02
Oberstammheim (ZH)	440	90	1.02	0.06	4.41
Rüti ZH (ZH)	600	535	0.19	0.01	0.82
Zollikon (ZH)	540	461	0.44	0.07	1.35

^a Confidence interval = 95%.

^b AG, Aargau; BE, Bern; LU, Lucerne; OW, Obwalden; SG, St. Gallen; SH, Schaffhausen; SO, Solothurn; SZ, Schwyz; TG, Thurgau; UR, Uri; VD, Vaud; VS, Valais; ZG, Zug; ZH, Zurich.

^c Total number of analyzed ticks, i.e., nymphs, adult male, and adult female ticks. Ticks were analyzed in pools of 10 (nymphs) or 5 (adult male or adult female ticks).

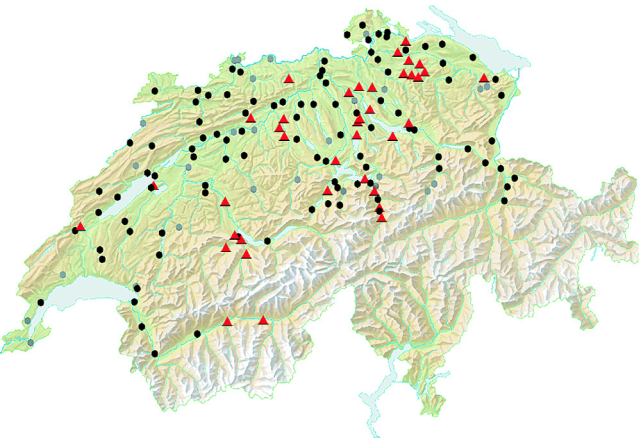


FIG. 1. TBE risk map based on tick surveillance data. Foci of endemicity are marked with red triangles, and collection sites where TBEV is not endemic are marked with circles (black, $n \geq 200$; gray, $n < 200$).

tEX is an adsorption resin provided in tablet form that has previously been shown to remove inhibitors and thus improve pathogen detection in animal samples (26).

As estimated, homogenizing ticks in a buffer solution supplemented with InhibitEX improved NA extraction using the QIA Symphony SP system (Tables 5 and 6). This effect, unexpectedly, was even more considerable when processing virus dilution series prepared in pure solutions. Since pure solutions are expected not to contain any inhibitory substances, we suppose that InhibitEX directly affects the subsequent real-time RT-PCR. Further experiments quantifying serial dilutions of viral RNA and standard RNA in pure D-PBS solution or D-PBS supplemented with InhibitEX (both processed in the QIA Symphony SP system and used as diluents) (data not shown) confirmed the positive effect on the amplification step. Although there was no significant improvement of PCR efficiency, the lowered C_q values let us hypothesize that InhibitEX improves RNA accessibility, possibly by reducing the formation of secondary structures. Some components of the absorp-

tive resin thus seem to remain in the eluate of magnetic particle-purified samples and affect the real-time RT-PCR.

Despite the improvement attributable to the use of InhibitEX tablets, the optimized protocol still performed worse than the precipitation procedure for low virus concentrations (5×10^2 virus genome equivalents/ μ l). However, this turned out to be of minor importance when applying the method in our large-scale survey; all TBEV-positive samples reached Cq values of between 16.84 and 24.64 (data not shown), corresponding to concentrations obviously higher than 5×10^2 viral genome equivalents/ μ l. In addition, the low CVs for the quantification of the IPC confirmed the high reproducibility of the automated method.

The established molecular test procedure proved to be appropriate for tick surveys. We applied the protocol in a national study on the prevalence of TBEV in ticks. The assessed mean virus prevalence of 0.46% in areas of endemicity (Table 7; Fig. 1) is in agreement with the average virus prevalence of 0.5 to 5% found in foci of endemicity in Europe (10, 25, 31). While we could confirm endemicity in several regions, no TBEV-positive ticks could be detected in some areas with confirmed human cases of TBE (national surveillance data on human disease cases from 1984 to 2008 were kindly provided by H. P. Zimmermann, Federal Office for Public Health, Switzerland). However, since areas of TBE endemicity are limited to strict regions (foci) (2, 10), the prevalence data derived from the samples in our cross-sectional study may not be generalized. They merely provide an indication of the tick infection rate in the very discrete area under investigation and are valid for only the time of the study. Nevertheless, the data are an important completion of risk assessment and monitoring of TBE in Switzerland. Interestingly, we could identify two new TBE foci in a southern region of Switzerland where TBE was so far not known to be endemic (Canton Valais, communes Salgesch and Raron). We could also detect TBEV-infected ticks in communes (Freienbach [Schwyz], Gersau [Schwyz], and Oensingen [Solothurn]) where only isolated disease cases have been reported. Furthermore, the virus could be detected in a commune (Steinhausen, Zug), where the last disease case was reported 10 years ago. All regions of endemicity were situated between 410 (Gipf-Oberfrick, Aargau) and 890 (Langnau am Albis, Zurich) meters above sea level. For a total of 33 collection sites, the reduced sample size ($n < 200$) could lead to a false interpretation of an area with an effective virus prevalence of 0.5% or smaller.

Sixty-three of 71 TBE virus isolates detected by PCR could successfully be propagated on cell culture. Eight isolates, however, though present at low concentrations throughout the incubation period, did not proliferate. It has been suggested that TBE viruses exist as a heterogeneous population that contains virus variants most adapted to reproduction in either ticks or mammals (32). Probably the ratio of these variants was very high in favor of tick-adapted quasispecies in these eight isolates, whereas virus reproduction in porcine kidney stable cells was inefficient. Further cultivation of the isolates would possibly select mammal-adapted quasispecies, shifting the ratio of the variants and thus enhancing virus propagation in cell culture. This hypothesis has to be confirmed by indirect immunofluorescence, which allows for the quantification of TBEV-infected cells. However, the fact that all virus isolates could be

recovered in cell culture excludes false-positive PCR test results. This conclusion is also supported by the successful detection of the internal process control in all tested samples.

In summary, we have developed and validated an analytical system based on PCR which can be applied in tick-borne encephalitis surveillance. The efficiency of the method was confirmed in a tick survey, where more than 60,000 ticks were screened for the presence of TBE virus. For the present, we focused on sensitive detection of TBEV by PCR and subsequent propagation of the virus. Further work will concentrate on the molecular characterization of all TBEV isolates by specific gene sequencing reactions and whole-genome sequencing for detailed taxonomic identification. In addition, all tick samples will be analyzed for the presence of other tick-borne pathogens, including species of *Rickettsia*, *Francisella*, and *Ehrlichia/Anaplasma*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Lise Gern (Institute of Zoology, University of Neuchâtel, Switzerland) for her technical advice concerning tick collection and for providing strains of *Borrelia*. Special thanks go to Daniel Růžek (Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic) for providing TBEV strains, for helpful advice concerning viral cultures, and for valuable discussions. Many thanks go to Hans Peter Zimmermann (Federal Office for Public Health) for detailed information on human disease case reporting (1984 to 2008). Tick collection was supported by the Spiez Laboratory and the Swiss Army. We particularly thank Michael Hächler and Mario Burger for permitting this project, as well as technical officers Daniel Kohler and Patrick Müller for coordinating the collection activities. Many thanks go to Fritz Wüthrich, Björn Hagmann, Johanna Signer, and Jasmine Portmann for their excellent laboratory assistance. We also thank Marcus Doherr (Vetsuisse Faculty, University of Bern) for his advice on statistical evaluation of epidemiological data. Finally, we thank André Pignolet (Spiez Laboratory) for his support in generating the map of the tick collection sites.

This work was supported by a research grant (353000874) from the Federal Office for Civil Protection (FOPC), Federal Department of Defense, Civil Protection and Sports (DDPS).

REFERENCES

- Abel, U., R. Schosser, and J. Süss. 1999. Estimating the prevalence of infectious agents using pooled samples: biometrical considerations. *Zentralbl. Bakteriol.* **289**:550–563.
- Casati, S., L. Gern, and J. C. Piffaretti. 2006. Diversity of the population of tick-borne encephalitis virus infecting Ixodes ricinus ticks in an endemic area of central Switzerland (Canton Bern). *J. Gen. Virol.* **87**:2235–2241.
- Charrel, R. N., H. Attoui, A. M. Butenko, J. C. Clegg, V. Deubel, T. V. Frolova, E. A. Gould, T. S. Gritsun, F. X. Heinz, M. Labuda, V. A. Lashkevich, V. Loktev, A. Lundkvist, D. V. Lvov, C. W. Mandl, M. Niedrig, A. Papa, V. S. Petrov, A. Plyusnin, S. Randolph, J. Süss, V. I. Zlobin, and X. de Lamballerie. 2004. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**:1040–1055.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156–159.
- Crowder, C., M. Rounds, C. Phillipson, J. Picuri, H. Matthews, J. Halverson, S. Schutzer, D. Ecker, and M. Eshoo. 2010. Extraction of total nucleic acids from ticks for the detection of bacterial and viral pathogens. *J. Med. Entomol.* **47**:89–94.
- Danielova, V., J. Holubova, M. Pejnoch, and M. Daniel. 2002. Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus. *Folia Parasitol. (Praha)* **49**:323–325.
- Donoso Mantke, O., S. W. Aberle, T. Avsic-Zupanc, M. Labuda, and M. Niedrig. 2007. Quality control assessment for the PCR diagnosis of tick-borne encephalitis virus infections. *J. Clin. Virol.* **38**:73–77.
- Donoso Mantke, O., R. Schadler, and M. Niedrig. 2008. A survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries. *Euro Surveill.* **13**.
- Duke, G. M., and A. C. Palmenberg. 1989. Cloning and synthesis of infectious cardiomyovirus RNAs containing short, discrete poly(C) tracts. *J. Virol.* **63**:1822–1826.

10. **Dumpis, U., D. Crook, and J. Oksi.** 1999. Tick-borne encephalitis. *Clin. Infect. Dis.* **28**:882–890.
11. **Ecker, M., S. L. Allison, T. Meixner, and F. X. Heinz.** 1999. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J. Gen. Virol.* **80**:179–185.
12. **Farrington, C. P.** 1992. Estimating prevalence by group testing using generalized linear models. *Stat. Med.* **11**:1591–1597.
13. **Federal Office for Public Health.** 2009, posting date. Infectious diseases—information on tick-borne encephalitis. <http://www.bag.admin.ch/themen/medizin/00682/00684/01114/index.html?lang=de>.
14. **Gresikova, M., and M. Kaluzova.** 1997. Biology of tick-borne encephalitis virus. *Acta Virol.* **41**:115–124.
15. **Gresikova, M., M. Sekeyova, S. Stupalova, and S. Necas.** 1975. Sheep milk-borne epidemic of tick-borne encephalitis in Slovakia. *Intervirology* **5**:57–61.
16. **Gritsun, T. S., T. V. Frolova, A. I. Zhankov, M. Armesto, S. L. Turner, M. P. Frolova, V. V. Pogodina, V. A. Lashkevich, and E. A. Gould.** 2003. Characterization of a Siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *J. Virol.* **77**:25–36.
17. **Gritsun, T. S., V. A. Lashkevich, and E. A. Gould.** 2003. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* **57**:129–146.
18. **Heinz, F. X., M. S. Collett, R. H. Purcell, E. A. Gould, C. R. Howard, M. Houghton, R. J. M. Moormann, C. M. Rice, and H. J. Thiel.** 2000. Family *Flaviviridae*, p. 859–878. In M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. Carstens, M. K. Estes, S. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. McGeogh, C. R. Pringle, and R. B. Wickner (ed.), *Virus taxonomy*. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, CA.
19. **International Scientific Working Group on TBE.** 2009, posting date. Epidemiology of TBE. <http://www.isw-tbe.info/tbe.aspx>.
20. **Korenberg, E. I., and Y. V. Kovalevskii.** 1995. Variation in parameters affecting risk of human disease due to TBE virus. *Folia Parasitol. (Praha)* **42**:307–312.
21. **Labuda, M., O. Kozuch, E. Zuffova, E. Eleckova, R. S. Hails, and P. A. Nuttall.** 1997. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology* **235**:138–143.
22. **Mahoney, W., N. M. J. Vermeulen, and I. Afonina.** October 2008. Amplification methods. U.S. patent 20,080,248,474.
23. **Martin, L. R., G. M. Duke, J. E. Osorio, D. J. Hall, and A. C. Palmenberg.** 1996. Mutational analysis of the mengovirus poly(C) tract and surrounding heteropolymeric sequences. *J. Virol.* **70**:2027–2031.
24. **Moriarty, J. R., A. D. Loftis, and G. A. Dasch.** 2005. High-throughput molecular testing of ticks using a liquid-handling robot. *J. Med. Entomol.* **42**:1063–1067.
25. **Oehme, R., K. Hartelt, H. Backe, S. Brockmann, and P. Kimmig.** 2002. Foci of tick-borne diseases in southwest Germany. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**(Suppl. 33):22–29.
26. **Padley, D. J., S. B. Lucas, and J. Saldanha.** 2003. Elimination of false-negative hepatitis C virus RNA results by removal of inhibitors in cadaver-organ donor blood specimens. *Transplantation* **76**:432–434.
27. **Pospisil, L., L. Jandasek, and J. Pesek.** 1954. Isolation of new strains of meningoencephalitis virus in the Brno region during the summer of 1953. *Lek. List.* **9**:3–5. (In Czech.)
28. **Puchhammer-Stockl, E., C. Kunz, C. W. Mandl, and F. X. Heinz.** 1995. Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Clin. Diagn. Virol.* **4**:321–326.
29. **Ramakers, C., J. M. Ruijter, R. H. Deprez, and A. F. Moorman.** 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* **339**:62–66.
30. **Rampas, J., and F. Gallia.** 1949. Isolation of tick-borne encephalitis virus from ticks *Ixodes ricinus*. *Cas. Lek. Cesk.* **88**:1179–1180. (In Czech.)
31. **Randolph, S. E.** 2001. The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **356**:1045–1056.
32. **Romanova, L., A. P. Gmyl, T. I. Dzhanian, D. V. Bakhmutov, A. N. Lukashchev, L. V. Gmyl, A. A. Rumyantsev, L. A. Burenkova, V. A. Lashkevich, and G. G. Karganova.** 2007. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation. *Virology* **362**:75–84.
33. **Rudenko, N., M. Golovchenko, V. Cihlarova, and L. Grubhoffer.** 2004. Tick-borne encephalitis virus-specific RT-PCR—a rapid test for detection of the pathogen without viral RNA purification. *Acta Virol.* **48**:167–171.
34. **Ruzek, D., H. Stastna, J. Kopecky, I. Golovljova, and L. Grubhoffer.** 2007. Rapid subtyping of tick-borne encephalitis virus isolates using multiplex RT-PCR. *J. Virol. Methods* **144**:133–137.
35. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
36. **Schrader, C., and J. Suss.** 1999. A nested RT-PCR for the detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in natural foci. *Zentralbl. Bakteriologie* **289**:319–328.
37. **Schwaiger, M., and P. Cassinotti.** 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.* **27**:136–145.
38. **Sparagano, O. A., M. T. Allsopp, R. A. Mank, S. G. Rijpkema, J. V. Figueroa, and F. Jongejan.** 1999. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (*Acari: Ixodidae*): a review. *Exp. Appl. Acarol.* **23**:929–960.
39. **Suss, J.** 2003. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine* **21**(Suppl. 1):S19–S35.
40. **Suss, J.** 2008. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond—the epidemiological situation as of 2007. *Euro Surveill.* **13**:1–8.
41. **Suss, J., and C. Schrader.** 2004. Tick-borne human pathogenic microorganisms found in Europe and those considered nonpathogenic. I. Ticks and viruses. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **47**:392–404. (In German.)
42. **Suss, J., C. Schrader, U. Falk, and N. Wohanka.** 2004. Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany—epidemiological data, development of risk areas and virus prevalence in field-collected ticks and in ticks removed from humans. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**(Suppl. 37):69–79.
43. **Wicki, R., P. Sauter, C. Mettler, A. Natsch, T. Enzler, N. Pusterla, P. Kuhnert, G. Egli, M. Bernasconi, R. Lienhard, H. Lutz, and C. M. Leutenegger.** 2000. Swiss Army Survey in Switzerland to determine the prevalence of *Francisella tularensis*, members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and tick-borne encephalitis virus in ticks. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**:427–432.
44. **Zilber, L. A.** 1939. Spring (spring-summer) epidemics of tick-borne encephalitis. *Arch. Biol. Nauk* **56**. (In Russian.)

6.2 Phylogenetic and Virulence Analysis of Tick-Borne Encephalitis Virus Field Isolates from Switzerland

Submitted to "Journal of Medical Virology" on 24 August 2010

Rahel Gäumann¹, Daniel Růžek², Kathrin Mühlemann¹, Marc Strasser³, Christian M. Beuret^{3*}

¹Institute for Infectious Diseases, University of Bern, Friedbühlstrasse 51, 3010 Bern, Switzerland; ²Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Science of the Czech Republic, Branišovská 31, 37005 České Budějovice, Czech Republic; ³Spiez Laboratory, Federal Office for Civil Protection, Austrasse, 3700 Spiez, Switzerland; *Correspondence: Phone: 41 (33) 228 16 64. Fax: 41 (33) 228 14 02. E-mail: christian.beuret@babs.admin.ch

Abstract	249 words
Text	4,241 words
Figures	3
Tables	2
References	37

Footnotes: The GenBank accession numbers for the tick-borne encephalitis virus envelope gene sequences determined in this study are summarized in Table 1

ABSTRACT

Tick-borne encephalitis (TBE) is an endemic disease in Switzerland, with about 110 – 120 reported human cases each year. Endemic areas are present throughout the country. However, the viruses circulating in Switzerland have not been characterized so far. In this study, the complete envelope (E) protein sequences and phylogenetic classification of 72 TBE viruses found in *Ixodes ricinus* ticks sampled at 39 foci throughout Switzerland were analyzed. All isolates belonged to the European subtype and were highly related (mean pairwise sequence identity of 97.8 % at the nucleotide and 99.6 % at the amino acid level of the E protein). Sixty-four isolates were characterized *in vitro* with respect to their plaque phenotype, since this has been associated with virulence. Two thirds (67 %) of isolates produced a mixture of plaques of different sizes, reflecting a heterogeneous population of virus variants. Isolates consistently forming plaques of small size, indicating low virulence, were associated with recently detected endemic foci with no or only sporadic reports of clinical cases. All of six virus isolates investigated in an *in vivo* mouse model were highly neurovirulent (100% mortality) but exhibited a relatively low level of neuroinvasiveness, with mouse survival rates ranging from 50 to 100 %. Therefore, TBE viruses circulating in Switzerland belong to the European subtype and are closely related. *In vitro* and *in vivo* surrogates of virulence suggest a high proportion of isolates with relatively low neuropathogenic potential, which is in agreement with a hypothesized high proportion of subclinical or mild TBE cases.

INTRODUCTION

Tick-borne encephalitis (TBE) is caused by the tick-borne encephalitis virus (TBEV), a member of the family *Flaviviridae*, and is the most important arboviral neuroinfection in Europe and northern Asia [Gritsun et al., 2003]. TBEV is an enveloped virus with a positive-stranded RNA genome approximately 11 kilobases in length. The genome contains a single open reading frame encoding a polyprotein of about 3400 amino acids that is cleaved into three structural (capsid, membrane, envelope) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) [Chambers et al., 1990; Lindenbach and Rice, 2001]. The envelope (E) protein is an especially important determinant of flavivirus virulence. Accordingly, mutations in E gene sequences are frequently reported in association with changes in pathogenic properties of the virus [Hurrelbrink and McMinn, 2003]. Also, most studies on the molecular epidemiology of TBEV have focused on the E protein. Three genetic lineages, or subtypes, have been distinguished based on sequence analysis of this protein: a European, a Siberian, and a Far Eastern subtype [Ecker et al., 1999].

In TBE-endemic regions, the virus circulates in areas limited to strict geographic regions, so-called disease foci [Dumpis et al., 1999]. Within these foci, TBEV is maintained in cycles involving *ixodid* ticks (*Ixodes ricinus* in Switzerland) acting as virus vectors and reservoirs, and vertebrate reservoir hosts (mainly rodents) [Labuda et al., 1993].

During a TBE surveillance study performed in 2009, 38 foci distributed throughout Switzerland were identified, with a mean virus prevalence of 0.46 % [Gaumann et al., 2010]. Endemic areas were mapped by screening 62,343 *I. ricinus* ticks for the presence of TBEV using real-time RT-PCR, and virus field isolates could successfully be recovered from most of the 72 TBEV-RNA-positive tick samples.

This study describes the phylogenetic classification and E gene sequence analysis of 72 Swiss TBE viruses. For 64 isolates, growth characteristics were investigated *in vitro*. Furthermore, six selected isolates were characterized with respect to their neuroinvasiveness and neurovirulence properties in an adult laboratory mouse model.

MATERIALS AND METHODS

Virus isolates and cells

The TBEV field isolates characterized in this study were detected in *I. ricinus* ticks sampled at 38 TBE foci distributed throughout Switzerland in 2009 (n = 71) and an additional focus in 2008 (BE Spiez, Auwald) (Table 1) [Gaumann et al., 2010]. Viruses were propagated through porcine kidney stable (PS) cells as described before [Gaumann et al., 2010] and stored at -80 °C; in majority, the first PS cell culture passage was used for the analyses performed in this study. However, 9 real-time RT-PCR-positive tick homogenate samples only reached extremely low titers in the first and were negative in the second PS cell culture passage (AG Brittnau 3, AG Zofingen1, BE Erlenbach i.S.3, BE Thun, LU Dagmarsellen3, ZG Steinhausen3, ZH Aeugst a.A.1, ZH Langnau a.A.2, ZH Oberstammheim). For these samples, tick homogenate stored at -80 °C was directly used for nucleic acid extraction, E gene amplification, and sequencing (see below). Also, isolation of TBEV out of these samples was attempted using *I. ricinus* cell cultures. For this purpose, IRE/CTMV19 cells [Bell-Sakyi et al., 2007; Ruzek et al., 2008a] were cultured in 24-well plates and inoculated with 100 µl of the tick homogenate. After 5 days of incubation at 28°C and 0.5% CO₂, the cells were disrupted by three cycles of freezing and thawing. The material was clarified by centrifugation, and 100 µl of supernatant used for the next passage. After three passages, the culture media were investigated for the presence of TBEV RNA by real-time RT-PCR as specified below.

Plaque assay

Plaque morphology and virus titers were assayed on PS cell monolayers as described before [De Madrid and Porterfield, 1969]. Infectivity was expressed as plaque forming units (pfu) ml⁻¹ and compared to genome equivalents ml⁻¹ of the respective samples determined by real-time RT-PCR (see below), giving a genome equivalent/infectious particle ratio for each isolate. Correlation was analyzed using Pearson's correlation analysis; a *P* value of < 0.05 was regarded as significant. To investigate the correlation between plaque morphology and genome equivalent/infectious particle ratio, the isolates were grouped according to their plaquing phenotypes (small, mixed, large) and a one-way ANOVA was performed on

the respective genome equivalent/infectious particle ratios; a *P* value of < 0.05 was regarded as significant.

Neurovirulence and neuroinvasiveness analysis

To assess neurovirulence, groups of 5 adult CD1 outbred mice (females, 5-week-old; Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) were inoculated intracerebrally with 10 pfu of virus. Neuroinvasiveness was estimated by subcutaneous inoculation of groups of 10 adult CD1 outbred mice (females, 6-week-old; Charles River Laboratoires, Sulzfeld, Germany) with 100 pfu of the virus. Sterilized pellet diet and water were supplied *ad libitum*. In all experiments, mice were scored for mortality for a period of 28 days p.i and survival curves were established.

Nucleic acid extraction and quantification of TBEV RNA

Nucleic acid extraction out of tick homogenate or cell culture supernatant was performed using the QIAAsymphony® SP system (QIAGEN) as described before [Gaumann et al., 2010]. Purified RNA was quantified using real-time RT-PCR and assessed genome equivalents ml⁻¹ were calculated according to the formula $Cq = \text{Slope} \times \log_{10}(\text{genome equivalents}) + (Y - \text{intercept})$, with the slope being -3.269 and the Y-intercept being 37.19, as derived from linear regression analysis of the standard curve of the used assay [Gaumann et al., 2010]. Additionally, RNA was subjected to amplification and sequencing reactions as specified below.

TBEV E gene amplification and sequencing

Three specific primer pairs were used for cDNA synthesis and PCR amplification of fragments covering the complete E protein coding region of European subtype TBEV (Table 2). Reactions were performed according to the manufacturer's instructions using the SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity kit (Invitrogen Life Technologies™). Successful fragment amplification was verified using QIAxcel (QIAGEN) and products were purified using QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Sequencing reactions were

carried out by Microsynth using the 3730xl DNA Analyzer and the BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Sequence analysis

The obtained sequences were processed with the Geneious Pro 4.8.5 software suite [Drummond et al., 2009] and aligned using ClustalW2 [Larkin et al., 2007]. Phylogenetic analysis included 9 reference sequences [Ecker et al., 1999] to confirm European subtype classification of the Swiss isolates and was performed by the neighbor-joining method with Jukes-Cantor distances [Jukes and Cantor, 1969]. Louping ill virus (GenBank M94957) was used as an outgroup and the reliability of internal branches was assessed by bootstrapping with 1,000 pseudoreplicates [Felsenstein, 1985]. Geographic clustering of phylogenetic clades was analyzed using the software ArcGIS™ 9.3 (ESRI®).

RESULTS

Virus isolation

Sixty three TBEV isolates were successfully recovered from the 72 TBEV-RNA positive tick homogenates using porcine kidney stable (PS) cells (Table 1). For nine samples negative in the second PS cell culture passage, isolation attempts using cultures of *I. ricinus* tick cells [Ruzek et al., 2008a] yielded one additional isolate after three blind passages (isolate AG Brittnau3). The 64 TBEV isolates were characterized in more detail. For phylogenetic and sequence analyses the eight samples negative in PS and tick cell cultures were also included.

Plaque phenotype

Plaque phenotypes of the 64 isolates were analyzed on cultures of PS cells, which are exceptionally useful for assessing basic phenotype characteristics of flaviviruses as well as many other arboviruses [Kozuch and Mayer, 1975]. Twenty nine (45.3 %) of the 64 virus isolates showed a homogeneous plaque phenotype: 10 (6.4%) isolates formed mostly or only large (>3mm) plaques, two (3.1%) isolates formed only medium (3-1 mm) sized plaques, and 17 (26.6%) viruses produced just small (<1mm) plaques (Table 1). The remaining 35 (67%) isolates showed a mixed plaque phenotype. Only one isolate, VD Cudrefin, generated very diffuse and barely discernable plaques, whereas the remaining isolates produced plaques with sharp contours. Viruses recovered in the cantons Solothurn (SO), Schwyz (SZ), Valais (VS), and Zug (ZG) consistently formed small or medium plaques.

The genome equivalent/infectious particle ratio for each TBEV isolate was calculated as an indicator for the amount of viral particles not able to produce plaques. Infectious titers were clearly correlated to the genome equivalents in a sample, ($P < 0.0001$, Pearson's correlation analysis, $r^2 = 0.4423$). However, the ratios varied from $10^{2.373}$ to $10^{4.778}$ (mean $10^{3.955}$, $\pm 10^{3.966}$). Furthermore, the ratios were significantly higher for isolates producing only small plaques than for viruses producing plaques of large or mixed size ($P < 0.05$ for pairwise comparison of small to large and small to mixed plaque producers, Bonferroni posttest following one-way ANOVA) (Figure 1).

Virulence of six selected TBEV isolates

Using a mouse model, neuroinvasiveness (subcutaneous inoculation) and neurovirulence (intracranial inoculation) of six Swiss TBEV isolates were compared, which had been selected on the basis of their position within the phylogenetic tree (see below), their geographic location, and/or their plaque properties. All except of one virus showed pathogenic potential with respect to neuroinvasiveness. Within the observation period of 28 days, however, isolate ZH Langnau a.A.1 did not cause disease in any of the inoculated mice. Neuroinvasiveness was highest for isolates SZ Gersau, TG Wängi 6, and VS Raron causing death in 50 % of inoculated animals and lower (20-30%) for isolates SO Oensingen3 and BE, Spiez, Auwald, respectively. In contrast, all of the six tested isolates were highly neurovirulent, with 100 % of mice dying within seven to nine days post infection (Figure 2, Table 1).

E gene sequence analysis of the 72 TBE viruses

The E gene sequences of all Swiss TBE viruses (n = 72) were determined and aligned, revealing an overall nucleotide sequence identity of 84.9 % (1,264/1,488). In pairwise comparison, the isolates showed a sequence identity of 96.3 to 100 % (mean: 97.8 %). At the deduced amino acid (aa) level, the isolates differed by one to four aa per isolate from the European prototype strain Neudoerfl (U27495) (Table 1). In total, 25 of 72 viruses (34.72%) showed one, 24 viruses (33.33%) two, 15 viruses (20.85%) three, and eight viruses (11.11%) four substitutions at the protein level. Whereas most substitutions were conservative, a total of seven substitutions were non-conservative. Altogether, a total of 30 different aa substitutions located throughout the E protein were observed, whereby the overall aa sequence identity of Swiss TBEV was appointed to 94 % (466/496) with pairwise aa sequence identities ranging from 98.8 to 100 % (mean: 99.6 %). With reference to the three-dimensional structure of the E protein of the strain Neudoerfl [Rey et al., 1995], six of the substitutions were located in domain I, 12 substitutions were found in domain II, four in domain III, and eight positions were situated in the stem-anchor region (Table 1).

Among the six substitutions in domain I (T13S, A47S, Y49C, N52S, A153V, I167V, and A189T) described for the Swiss TBEV, there was one directly adjacent to the E protein glycosylation site (A153V). Unfortunately, the only virus exhibiting this

mutation (ZG Steinhausen3) could not be recovered from the tick sample by cell culture. However, isolate ZG Steinhausen4 showing an ambiguity at this position (A or V) produced mostly small plaques. Another variation observed in domain I was the substitution of the apolar, hydrophobic residue alanine 47 located in the β -sheet facing the external surface [Rey et al., 1995] by a polar serine, which could possibly disrupt the sheet structure. A potential effect on the virulence properties of LU Dagmarsellen3 showing this mutation, however, could not be investigated, since the virus could not be isolated by cell culture. With exception of TG Lommis2, isoleucine at position 167 of strain Neudoerfl was replaced by valine in all isolates, which, however, is a highly conservative substitution. Within domain II of the E protein, 12 aa substitutions were found (N52S, K55R, T81I, T128I, H130Y, V198I, V206A, E230D, N234T, R240S, K266R, and K280R). Ten out of these (i.e. all but T81I, R240S) were located in the hinge region of the domain. Furthermore, four different mutations (A317V, A346V, H346R, and V347A) were located within domain III of the E protein. Finally, a total of 15 isolates showing substitutions in the stem-anchor region of the E protein were identified. Thereof, two isolates held substitutions in an α -helical region of the stem (V437A, T439M), eight isolates had a substitution within the first (K457R, L460V, A463V), and five isolates were mutated within the second transmembrane segment (N473K, L481I, A483T) of the anchor.

Phylogenetic analysis

A phylogenetic tree based on the E gene sequences of all 72 Swiss TBE viruses was estimated using the neighbor-joining method with Jukes-Cantor distances (Figure 3a, b). All of the Swiss TBEV belonged to the European TBEV subtype and clustered into 10 clades, with two isolates (SZ Gersau and VD Cudrefin) representing isolated branches of the tree. Within the main clades, isolates from four Swiss cantons (Bern [BE], Solothurn [SO], Uri [UR], Valais [VS]), formed clearly separated lineages. In a lesser extent, this was also observed for viruses originating from the canton Aargau (AG). In the other cantons, a mixture of viral lineages was observed. Moreover, no correlation between genetic lineages and plaque phenotypes was found.

DISCUSSION

TBE is endemic in Switzerland, where the first human disease cases have been described in 1969 [Spiess et al., 1969]. After a significant increase of TBE incidence observed from 2002 to 2006 with a maximum of 245 registered clinical infections, about 110 to 120 annual disease cases have been reported during the past three years [FOPH, 2010]. Endemic foci, as defined by human disease case mapping, are prominently found in areas of northern Switzerland. However, infections with TBEV have also been reported from the central and western parts of the country [FOPH, 2010]. Furthermore, a number of additional foci in central and southern Switzerland have recently been identified by screening ticks on the presence of the virus [Gaumann et al., 2010]. Despite this sustained endemicity, however, no characterization of the viruses circulating in Switzerland has been done so far. In this study, the phylogenetic classification and E gene sequence analysis of 72 Swiss TBE viruses as well as the *in vitro* virulence characteristics of a total of 64 TBEV isolates and *in vivo* virulence of six TBEV isolates recovered from questing *I. ricinus* ticks in different parts of Switzerland are described.

It has been generally accepted that TBEV field isolates recovered from questing ticks are neuropathogenic and cause lethal infections in mice following both intracranial and peripheral inoculation [Mandl, 2005]. The *in vitro* analysis of plaque size phenotypes was used for a first estimate of virus virulence, based on the observation that small plaque size correlates with low virus virulence, whereas larger plaque size indicates higher virulence. Interestingly, isolates originating from communes in four Swiss cantons (Solothurn [SO], Schwyz [SZ], Valais [VS], and Zug [ZG]) primarily formed small plaques and can therefore be regarded as low virulent. Most of these communes represent new TBE foci (SO Oensingen, SZ Freienbach, SZ Gersau, VS Raron, VS Salgesch) with no or only sporadic human disease cases [FOPH, 2010; Gaumann et al., 2010]. ZG Steinhausen, on the other hand, is known to be endemic since 1997, but the last clinical disease case in this area has been registered in the year 2000. The absence of reported TBE cases in these foci could be explained by the sole presence of attenuated isolates producing only subclinical or mild disease not diagnosed as TBE. Generally, an estimated percentage of 70 – 95 % of human infections with TBEV strains in Europe is either sub-clinical or asymptomatic [Ruzek et al., 2010].

Although small plaque-producing viruses were also recovered from established TBE foci, a co-circulation of viruses with different plaque phenotypes was shown for all except of one (ZH Rütli) of these areas. Actually, viral populations were heterogeneous for plaque phenotypes in about two third of the foci, supporting the assumed presence of different variants, or quasi-species [Mayer and Kozuch, 1969; Romanova et al., 2007].

During amplification of TBEV field isolates in cell culture, varying recovery rates of infectious virus could be explained by the production of non-infectious, or defect TBEV particles. The genome equivalent/infectious particle ratio showed a pronounced variability ($10^{3.955} \pm 10^{3.966}$), meaning that the proportion of defective viral particles, or variants being avirulent for mammalian cells, was highly variable among the field isolates investigated in this study. This is in agreement with the observed heterogeneous plaque population and further substantiates the presence of quasispecies [Romanova et al., 2007; Ruzek et al., 2008b]. Interestingly, the genome equivalent/infectious particle ratios were significantly higher for isolates producing small plaques than for viruses with large or mixed plaque phenotypes (Figure 1). Thus, the small plaque phenotype, indicating low virulence, correlates with a high amount of non-infectious viral particles produced during the virus replication cycle.

When characterizing six selected TBEV isolates with respect to their neuropathogenic potential in an *in vivo* animal model, consistently high neurovirulence but only medium or low levels of neuroinvasiveness were observed (Table 1, Figure 2). Such strains, although neurovirulent, being attenuated in their peripheral virulence, have previously been described in the Czech Republic [Kopecky et al., 1991; Ruzek et al., 2008b]. Most likely, the attenuation of neuroinvasiveness in these isolates is caused by a delay in virus replication kinetics, which may allow the immune system to clear the infection before the virus reaches the central nervous system [Hurrelbrink and McMinn, 2003]. Interestingly, the *in vivo* neuropathogenic properties of the investigated isolates did not necessarily correlate with the plaque phenotype described in the *in vitro* experiments. For example, isolate ZH Langnau a.A.1 showing an attenuated phenotype *in vivo* (completely non-neuroinvasive) was characterized as highly virulent *in vitro* (large plaques). The reduction in virus spread *in vivo* but not *in vitro* could be explained by mutations

affecting the ability of the isolate to replicate in particular cell types encountered in mammals. For instance, the inability to replicate in dendritic cells being the primary cellular targets of viral infection could cause attenuation of this isolate, as it has been demonstrated for other flaviviruses [Hurrelbrink and McMinn, 2003; McMinn et al., 1996]

When comparing the E protein sequences of the Swiss TBE viruses to the one of European prototype strain Neudoerfl, a total of 30 different aa substitutions located throughout the protein were observed. Some of these mutations were sited in or in close proximity to positions previously described to affect neuroinvasiveness or neurovirulence of flaviviruses [Hurrelbrink and McMinn, 2003]. For example, the substitution A153V is located directly adjacent to the E protein glycosylation site in domain I of the E protein. Furthermore, alterations at position 52 in the hinge region of domain II (N52S for a total of 17 Swiss isolates) possibly impair the protein's ability to mediate membrane fusion during the process of virus internalization [Chambers and Nickells, 2001; Hasegawa et al., 1992; Rey et al., 1995]. In addition, the substitutions V437A and T439M are located in the α -helical region of the stem, which has previously been found to be important for the stability of the prM-E-heterodimer [Allison et al., 1999]. However, no individual substitutions in the E protein could be clearly correlated with attenuation of virus virulence *in vivo* or *in vitro*. Thus, although the E protein is an important determinant of virulence, these observations strongly supports the presence of additional determinants of virulence in other genome regions, such as those previously described in the 3'- non-coding region, the capsid protein, as well as the non-structural genes NS2B and NS3 [Kofler et al., 2002; Mandl et al., 1998; Ruzek et al., 2008b].

Phylogenetically, Swiss TBE viruses clustered into 10 clades. Within the main branches of the tree, isolates from four Swiss cantons (Bern [BE], Solothurn [SO], Uri [UR], Valais [VS]) formed clearly separated lineages, indicating a high degree of isolation of the respective foci (Figure 3a, b). However, most isolates showed no clustering correlating with their geographic origin. Also, dissimilar plaque properties of isolates recovered from specific foci were sometimes observed (e.g. Wänig1 to Wänig6, Table 1). Thus, such foci are characterized by the presence of a heterogeneous population of isolates with varying genetic and biological properties. A high degree of variability of 15.1 % on the nucleotide level of the E protein

sequence was observed. However, pairwise comparison revealed a mean sequence identity of 97.8 %, and Swiss TBE viruses were found to be conserved on the amino acid level of the E protein, differing from the European prototype strain Neudoerfl by no more than 0.4 %. Likewise, some TBEV isolates from Italy differed from the Austrian strain Neudoerfl at only eight nucleotide positions within the E gene, and all these substitutions were synonymous [Hudson et al., 2001]. On the other hand, substantial variability of 55.5 % within partial 5'-UTR and C protein-coding regions has recently been demonstrated among TBEV isolated from a single endemic focus in central Switzerland [Casati et al., 2006]. Interestingly, in the present study there was no aa difference between 24 Swiss isolates recovered in 2009 (isolates exhibiting the substitution I167V alone) and the Swiss strain Iso 40 (AF091009) isolated in 1975. These findings agree with the previously described low degree of variation and antigenic homogeneity within the European TBEV subtype, probably favored by selection pressure [Ecker et al., 1999; Guirakhoo et al., 1987; Heinz et al., 1997; Heinz and Kunz, 1981; Heinz and Kunz, 1982].

To summarize, this study describes the basic characterization of TBEV isolates originating from established as well as emerging disease foci throughout Switzerland. Whereas many endemic areas are characterized by the presence of a heterogeneous population of TBEV variants circulating in questing *I. ricinus* ticks, some foci appear to be more isolated, maintaining the circulation of phylogenetically closely related strains. Among all isolates, a total of 30 different aa substitutions were identified in the E protein, none of which however could clearly be correlated with an attenuated phenotype. *In vivo* and *in vitro* characterizations of virus virulence indicated a high proportion of isolates with relatively low neuropathogenic potential. Viruses with low virulence were particularly associated with recently detected endemic foci with no or only sporadic reports of clinical cases. The low level of virulence is in agreement with a hypothesized high proportion of subclinical or mild TBEV infections and could involve an under-ascertainment of disease cases in Switzerland.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Johanna Signer and Jasmine Portmann for their excellent laboratory assistance and Olivier Engler for valuable discussions.

This work was supported by a research (353000874) grant of the Swiss Federal Office for Civil Protection (FOPC), Federal Department of Defense, Civil Protection and Sports (DDPS), a grant (P302/10/P438) from the Czech Science Foundation, as well as three grants (Z60220518, MSM 6007665801, and LC06009) from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

REFERENCES

- Allison SL, Stiasny K, Stadler K, Mandl CW, Heinz FX. 1999. Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E. *J Virol* 73(7):5605-5612.
- Bell-Sakyi L, Zweygarth E, Blouin EF, Gould EA, Jongejan F. 2007. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends Parasitol* 23(9):450-457.
- Casati S, Gern L, Piffaretti JC. 2006. Diversity of the population of Tick-borne encephalitis virus infecting *Ixodes ricinus* ticks in an endemic area of central Switzerland (Canton Bern). *J Gen Virol* 87(Pt 8):2235-2241.
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 44:649-688.
- Chambers TJ, Nickells M. 2001. Neuroadapted yellow fever virus 17D: genetic and biological characterization of a highly mouse-neurovirulent virus and its infectious molecular clone. *J Virol* 75(22):10912-10922.
- De Madrid AT, Porterfield JS. 1969. A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bull World Health Organ* 40(1):113-121.
- Drummond AJ, Ashton B, Cheung M, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones-Havas S, Thierer T, Wilson A. 2009. Geneious v 4.7, available from <http://www.geneious.com>.
- Dumpis U, Crook D, Oksi J. 1999. Tick-borne encephalitis. *Clin Infect Dis* 28(4):882-890.
- Ecker M, Allison SL, Meixner T, Heinz FX. 1999. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J Gen Virol* 80 (Pt 1):179-185.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*(39):783-791.
- FOPH. 2010. Federal Office for Public Health: Infectious Diseases - Information on tick-borne encephalitis
- Gaumann R, Muhlemann K, Strasser M, Beuret CM. 2010. High-throughput procedure for tick surveys of tick-borne encephalitis virus and its application in a national surveillance study in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 76(13):4241-4249.
- Gritsun TS, Lashkevich VA, Gould EA. 2003. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res* 57(1-2):129-146.
- Guirakhoo F, Radda AC, Heinz FX, Kunz C. 1987. Evidence for antigenic stability of tick-borne encephalitis virus by the analysis of natural isolates. *J Gen Virol* 68 (Pt 3):859-864.

- Hasegawa H, Yoshida M, Shiosaka T, Fujita S, Kobayashi Y. 1992. Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. *Virology* 191(1):158-165.
- Heinz FX, Ecker M, Mandl CW, Holzmann H. 1997. The molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus in Europe and Asia. In: Suss J, Kahl O, editors. *Tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis, Proc 4th International Potsdam Symposium on Tick-borne Diseases*. Lengerich, Germany: Pabst Science Publishers. p 27-33.
- Heinz FX, Kunz C. 1981. Homogeneity of the structural glycoprotein from European isolates of tick-borne encephalitis virus: comparison with other flaviviruses. *J Gen Virol* 57(Pt 2):263-274.
- Heinz FX, Kunz C. 1982. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: peptide mapping of large non-structural proteins of European isolates and comparison with other flaviviruses. *J Gen Virol* 62 (Pt 2):271-285.
- Hudson PJ, Rizzoli A, Rosa R, Chemini C, Jones LD, Gould EA. 2001. Tick-borne encephalitis virus in northern Italy: molecular analysis, relationships with density and seasonal dynamics of *Ixodes ricinus*. *Med Vet Entomol* 15(3):304-313.
- Hurrelbrink RJ, McMinn PC. 2003. Molecular determinants of virulence: the structural and functional basis for flavivirus attenuation. *Adv Virus Res* 60:1-42.
- Jukes TH, Cantor CR. 1969. Evolution of protein molecules In H.N. Munro (ed.), "Mammalian protein metabolism", pp. 21-132. Munro HN, editor. N.Y.: Academic Press, New York.
- Kofler RM, Heinz FX, Mandl CW. 2002. Capsid protein C of tick-borne encephalitis virus tolerates large internal deletions and is a favorable target for attenuation of virulence. *J Virol* 76(7):3534-3543.
- Kopecky J, Krivanec K, Tomkova E. 1991. Attenuated temperature-sensitive mutants of tick-borne encephalitis (TBE) virus isolated from natural focus. In: Dusbabek F, Bukya V, editors. *Modern Acarology*. Prague and The Hague: Academia and SPD Academic Publishing. p 11-19.
- Kozuch O, Mayer V. 1975. Pig kidney epithelial (PS) cells: a perfect tool for the study of flaviviruses and some other arboviruses. *Acta Virol* 19(6):498.
- Labuda M, Nuttall PA, Kozuch O, Eleckova E, Williams T, Zuffova E, Sabo A. 1993. Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature. *Experientia* 49(9):802-805.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21):2947-2948.

- Lindenbach BD, Rice CA. 2001. *Flaviviridae*: The viruses and their replication; in D.M. Knipe and P.M. Howley (ed.), "*Fields Virology*", 4th edn., pp. 991-1041. Knipe DM, Howley PM, editors. London, New York & Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins.
- Mandl CW. 2005. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Res* 111(2):161-174.
- Mandl CW, Holzmann H, Meixner T, Rauscher S, Stadler PF, Allison SL, Heinz FX. 1998. Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a flavivirus. *J Virol* 72(3):2132-2140.
- Mayer V, Kozuch O. 1969. Study of the virulence of tick-borne encephalitis virus. XI. Genetic heterogeneity of the virus from naturally infectious *Ixodes ricinus* ticks. *Acta Virol* 13(6):469-482.
- McMinn PC, Dalgarno L, Weir RC. 1996. A comparison of the spread of Murray Valley encephalitis viruses of high or low neuroinvasiveness in the tissues of Swiss mice after peripheral inoculation. *Virology* 220(2):414-423.
- Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC. 1995. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375(6529):291-298.
- Romanova L, Gmyl AP, Dzhivanian TI, Bakhmutov DV, Lukashev AN, Gmyl LV, Rumyantsev AA, Burenkova LA, Lashkevich VA, Karganova GG. 2007. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation. *Virology* 362(1):75-84.
- Ruzek D, Bell-Sakyi L, Kopecky J, Grubhoffer L. 2008a. Growth of tick-borne encephalitis virus (European subtype) in cell lines from vector and non-vector ticks. *Virus Res* 137(1):142-146.
- Ruzek D, Dobler G, Donoso Mantke O. 2010. Tick-borne encephalitis: Pathogenesis and clinical implications. *Travel Med Infect Dis*.
- Ruzek D, Gritsun TS, Forrester NL, Gould EA, Kopecky J, Golovchenko M, Rudenko N, Grubhoffer L. 2008b. Mutations in the NS2B and NS3 genes affect mouse neuroinvasiveness of a Western European field strain of tick-borne encephalitis virus. *Virology* 374(2):249-255.
- Spiess H, Mumenthaler M, Burkhard S, Keller H. 1969. [Zentraleuropäische Enzephalitis (Zeckenenzephalitis) in der Schweiz]. *Schweiz Med Wochenschr* 99:277-282.

TABLES

Table 1. Characteristics of 72 TBE viruses found in *Ixodes ricinus* ticks sampled at 39 TBE foci in Switzerland.

Virus*	GenBank accession number	Substitutions in E protein at amino acid level†	Plaque phenotype			Genome equivalent/ infectious particle ratio‡	Virulence§	
			Large (>3 mm)	Medium (1–3 mm)	Minute (<1 mm)		i.c.	s.c.
AG Brittnau1	HM468123	Y49C			+++	3.824	-	-
AG Brittnau2	HM468124	T81I			+++	3.318	-	-
AG Brittnau3	HM468125	I167V R240S	+++	+		3.699	-	-
AG Brittnau4	HM468126	I167V L481I		+++		3.988	-	-
AG Brittnau5	HM468127	I167V		+	++	3.369	-	-
AG Gipf-Oberfrick	HM168128	K55R		++	++	4.107	-	-
AG Zofingen1	HM468129	I167V		n.r.†		n.r.†	n.r.†	n.r.†
AG Zofingen2	HM468130	I167V			++	4.159	-	-
BE Belp	HM468131	I167V		+	++	3.248	-	-
BE Erlenbach i.S.1	HM468132	I167V	+++		+	4.172	-	-
BE Erlenbach i.S.2	HM468133	I167V		+	+++	4.040	-	-
BE Erlenbach i.S.3	HM468134	I167V		n.r.		n.r.	n.r.	n.r.
BE Erlenbach i.S.4	HM468135	I167V		++	+	3.956	-	-
BE Reichenbach i.K1	HM468136	I167V		+	++	3.857	-	-
BE Reichenbach i.K2	HM468137	I167V A346V		++	+	4.054	-	-
BE Spiez, Auwald	HM468138	I167V		+	++	3.734	100	20
BE Spiez, Rustwald1	HM468139	I167V	+	++		3.965	-	-
BE Spiez, Rustwald2	HM468140	I167V	+++	++		4.099	-	-
BE Thun	HM468141	I167V		n.r.		n.r.	n.r.	n.r.
LU Dagmarsellen1	HM468142	I167V	+++	+		3.510	-	-
LU Dagmarsellen2	HM468143	I167V		+	++	3.537	-	-
LU Dagmarsellen3	HM468144	A47S		n.r.		n.r.	n.r.	n.r.
LU Ebikon	HM468145	I167V V198I	+	++		3.689	-	-
OW Alpnach	HM468146	I167V N234T	+	++	++	4.037	-	-
SG Mörschwil1	HM468147	T128I		++	+	3.890	-	-
SG Mörschwil2	HM468148	T128I	++	++		3.683	-	-
SH Stein am Rhein	HM468149	I167V	++	++		3.496	-	-
SO Oensingen1	HM468150	I167V A317V			+++	3.701	-	-
SO Oensingen2	HM468151	I167V		++	++	3.508	-	-
SO Oensingen3	HM468152	I167V			+++	3.791	100	30
SZ Freienbach1	HM468153	N52S		+	+++	4.526	-	-
		I167V A189T						
		V206A						

SZ Freienbach2	HM468154	N52S	I167V	A189T	V206A				+++	4.244	-	-
SZ Gersau	HM468155	N52S	I167V	H347R				++	+	4.132	100	50
TG Aadorf	HM468156	H130Y	I167V			+		++	+	3.459	-	-
TG Frauenfeld	HM468157	T13S	I167V			++			++	3.423	-	-
TG Lommis1	HM468158	N52S	I167V					+	++	3.428	-	-
TG Lommis2	HM468159	N52S	I167V					+	+++	4.420	-	-
TG Lommis3	HM468160	N52S	I167V					+	++	4.231	-	-
TG Thundorf	HM468161	H130Y	I167V					+	++	3.640	-	-
TG Wängi1	HM468162	H130Y	I167V	A317V		+++		+	++	3.692	-	-
TG Wängi2	HM468163	H130Y	I167V	A317V				+	+++	3.726	-	-
TG Wängi3	HM468164	H130Y	I167V	A317V		+		++	++	3.662	-	-
TG Wängi4	HM468165	H130Y	I167V	A317V				+++	+++	3.699	-	-
TG Wängi5	HM468166	H130Y	I167V			+		+++	+++	3.881	-	-
TG Wängi6	HM468167	H130Y	I167V	K280R	A483T	+++		+	+	3.701	100	50
UR Schattdorf1	HM468168	N52S	I167V	L460V				+		3.625	-	-
UR Schattdorf2	HM468169	N52S	I167V	L460V		+		++		3.581	-	-
UR Silenen	HM468170	N52S	I167V	L460V				++	+	3.185	-	-
UR Sisikon1	HM468171	N52S	I167V	L460V		+++			+++	3.920	-	-
UR Sisikon2	HM468172	N52S	I167V	L460V					+	3.923	-	-
VD Cudrefin	HM468173	K55R	I167V	M306V						3.111	-	-
VD Rances1	HM468174	I167V				++		++		3.645	-	-
VD Rances2	HM468175	I167V				++			++	3.423	-	-
VS Raron	HM468176	I167V	T439M			+			+++	3.713	100	50
VS Salgesch	HM468177	I167V	V437A	T439M				+	+++	3.717	-	-
ZG Steinhausen1	HM468178	N52S	I167V					+	+++	4.778	-	-
ZG Steinhausen2	HM468179	N52S	I167V						+++	4.290	-	-
ZG Steinhausen3	HM468180	N52S	A153V	I167V	E230D			n.r.	+++	n.r.	n.r.	n.r.
ZG Steinhausen4	HM468181	N52S	A153V	I167V	E230D			+	+++	4.445	-	-
ZH Aeugst a. A.1	HM468182	H130Y	I167V					n.r.	+++	n.r.	n.r.	n.r.
ZH Aeugst a. A.2	HM468183	H130Y	I167V			+++				n.r.	-	-
ZH Bassersdorf1	HM468184	H130Y	I167V	A463V		++		++		2.372	-	-
ZH Bassersdorf2	HM468185	H130Y	I167V	A463V		+		++		3.992	-	-
ZH Elgg	HM468186	I167V				+++			+	3.955	-	-
ZH Langnau a.A.1	HM468187	I167V	K266R			+++				3.835	-	0
ZH Langnau a.A.2	HM468188	I167V	K266R			+++				2.806	100	0
ZH Oberstammheim	HM468189	K55R	I167V					n.r.		n.r.	n.r.	n.r.
ZH Rümlang	HM468190	I167V				++		n.r.	++	3.972	-	-
ZH Rüti	HM468191	N52S	I167V	V206A	K457R	+		+	+++	4.018	-	-
ZH Unterengstringen	HM468192	N52S	I167V						+++	3.320	-	-

c

ZH Zollikon1	HM468193	I167V	++	++	4.133	-
ZH Zollikon2	HM468194	I167V	++	++	4.173	-

* Virus names were derived from their geographic origin (canton, given in two-letter code, and commune). If more than one isolate was found in one focus, the isolates were numbered.

† Substitutions are given in reference to the E protein coding sequence of TBE Neudoerfl (GenBank U27495). Non-conservative amino acid substitutions (i.e. negative scores in BLSOUM62 matrix) are written in bold type. Ambiguities are italicized.

‡ Values represent the logarithm to the base 10 of the genome equivalent/infectious particle ratio.

§ Virulence was defined as the mortality rate of mice following intracerebral (i.c., n = 5) or subcutaneous (s.c., n = 10) inoculation with 10 or 100 pfu of virus, respectively. Mice were scored for mortality for a period of 28 days. More detailed virulence data are given in Fig. 1. - = not defined

| n.r. = isolate could not be recovered from tick sample using neither porcine kidney stable (PS) nor *I. ricinus* (IRE/CTMV19) cell lines.

Table 2. Primers used for cDNA synthesis, amplification and cycle sequencing of 3 fragments covering the complete E protein coding sequence of European subtype TBEV.

Target and description	Primer name	Sequence (5'→3')	Position on gene*	Product size (bp)	Annealing temperature
TBEV <i>E</i> gene, Fragment A					
Forward	TBEAF	TGTGTGGTTGACCCTGGAGAGTG	894-916	725	60 °C
Reverse	TBEAR	CCTGTGGACCTGCCAAGCCG	1604-1619		
TBEV <i>E</i> gene, Fragment B					
Forward	TBEBF2	CACTTTGGCTGAAGAACACC	1212-1231	730	60 °C
Reverse	TBEBR2	CATGCCCACTGTCTGTTGGAG	1922-1942		
TBEV <i>E</i> gene, Fragment C					
Forward	TBECF	TGGTTGAATTTGGGGCTCCTCACG	1694-1717	797	60 °C
Reverse	TBECR	TTCGTTCCGTGTCCACAGCGCA	2470-2491		

* Positions on gene are given according to the sequence of TBEV Neudoerfl (GenBank U27495)

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Genome equivalent/infectious particle ratios of TBEV isolates producing plaques of small, mixed, or large phenotype. The ratios were significantly higher for isolates producing only small plaques ($10^{4.172} \pm 10^{4.178}$) than for viruses producing plaques of mixed ($10^{3.840} \pm 10^{3.642}$) or large ($10^{3.790} \pm 10^{3.673}$) size. In pairwise comparison using Bonferroni posttest following one-way ANOVA, the *P* values were < 0.05 , < 0.01 , and > 0.05 when comparing small to large, small to mixed, and large to mixed plaque producers, respectively. Note that the ratios are shown in a logarithmic scale.

Figure 2. Virulence of TBEV field isolates for adult CD1 outbred mice. Neurovirulence (a) was assessed by intracerebrally inoculating groups of 5 animals with 10 pfu of virus, neuroinvasiveness (b) by subcutaneous infection of groups of 10 animals with 100 pfu of virus. Survival was recorded for a period of 28 days. Virus isolates: ○ BE Spiez, Auwald; ● SO Oensingen3; □ SZ Gersau; ■ TG Waengi6; △ VS Raron; ▲ ZH Langnau a.A.1. p.i. = post infection.

Figure 3. a) Phylogenetic tree (neighbor-joining, Jukes-Cantor distances) of Swiss TBEV field isolates. The tree is based on complete envelope gene sequences and includes 9 reference sequences (bold type). Louping ill virus was used as an outgroup. GenBank accession numbers are given in parentheses, and the bootstrap supports of clades (in %) are indicated above the branches. The scale bar corresponds to 0.03 nucleotide substitutions per site. Symbols assigned to each main clade, additionally marked by vertical lines, serve for differentiation of the lineages in Figure 2b. Colored symbols represent genetic lineages originating in distinct cantons. b) Geographic origin of TBEV isolates characterized in this study. Different symbols correspond to genetic lineages, as defined in Figure 2a.

FIGURES

Figure 1.

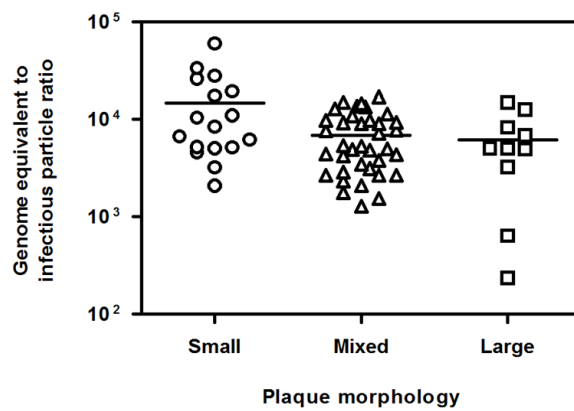


Figure 2.

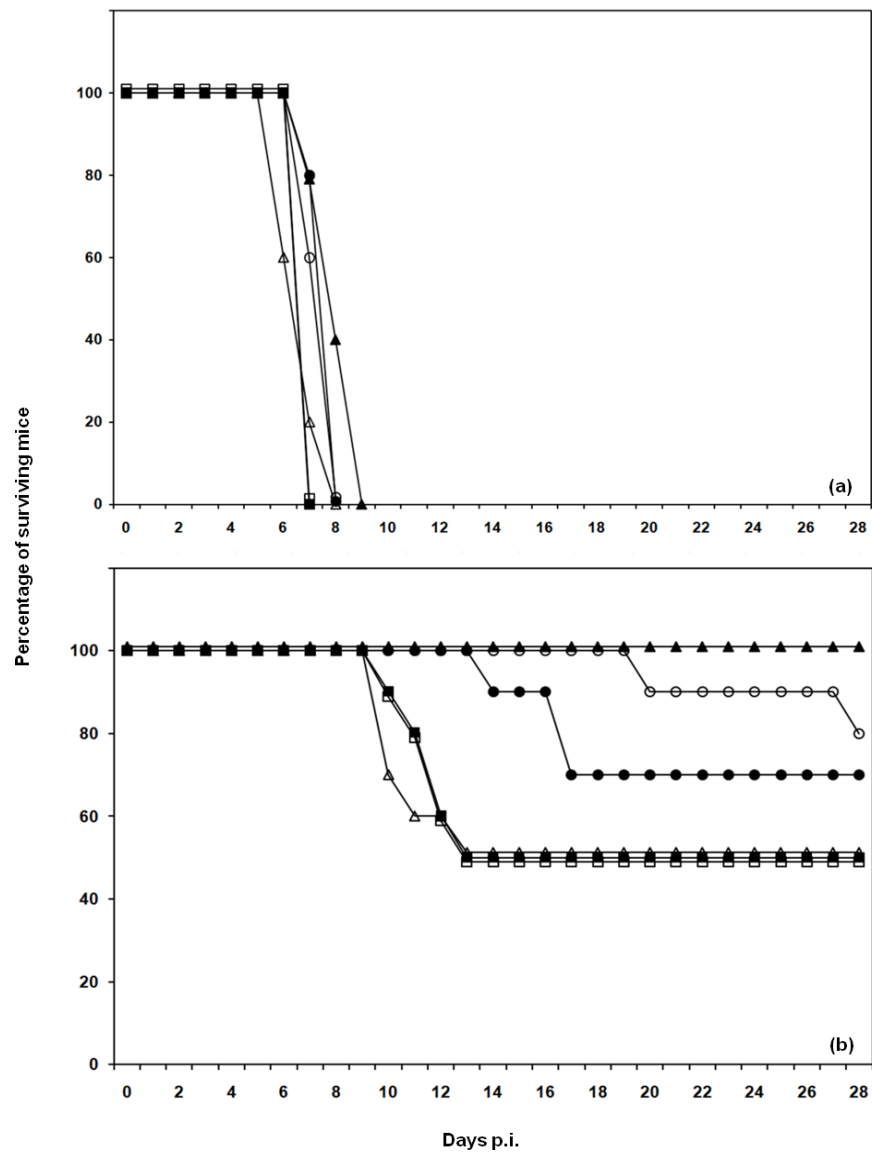


Figure 3a.

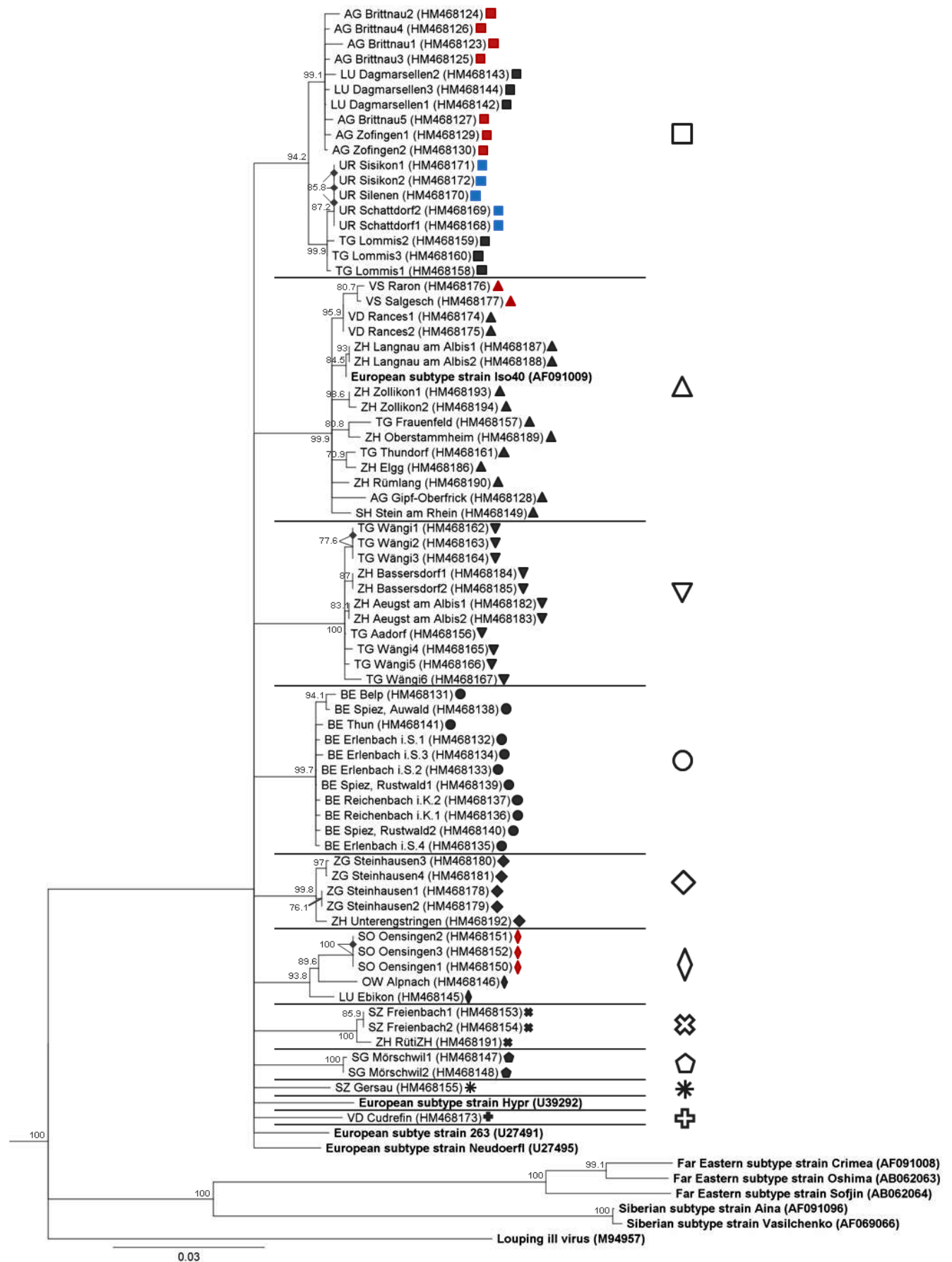
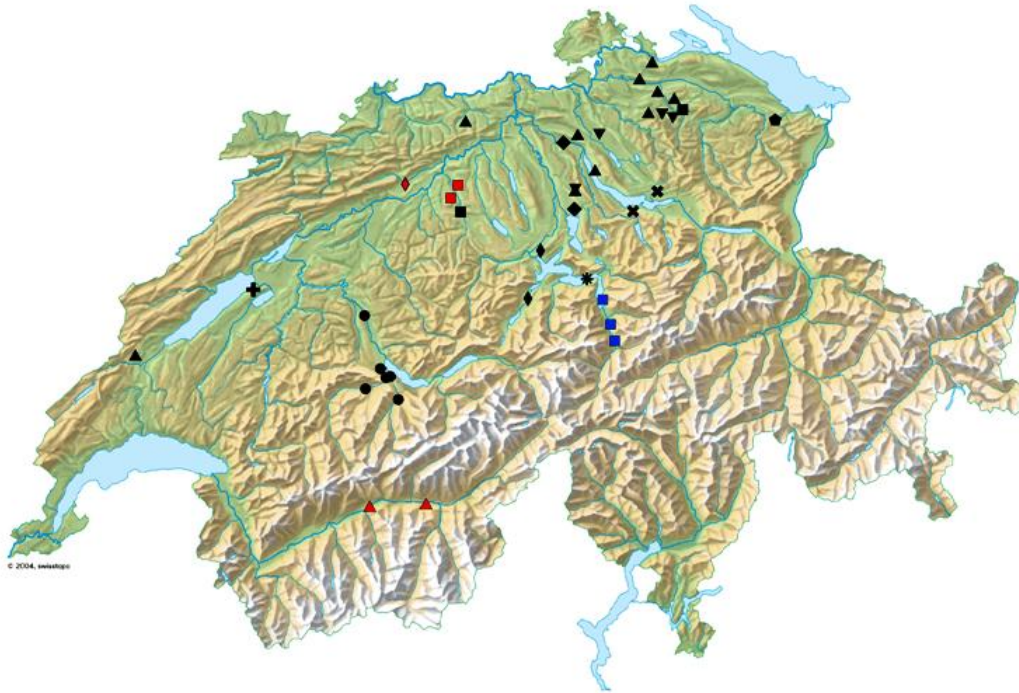


Figure 3b.



7 DISCUSSION AND OUTLOOK

TBE is the most important arboviral neuroinfection in Europe and northern Asia [17]. Despite the increasing endemicity and morbidity of the disease [2-4], only limited information on the epidemic activity of TBEV in Switzerland has been available so far. This thesis focused on the molecular epidemiology of TBEV in our country. The gained knowledge essentially contributes to an improved risk assessment of TBE in Switzerland and provides an important characterization of the molecular and biological properties of Swiss TBEV.

We performed a national screening study to assess the prevalence of TBEV in ticks. Although such surveys have previously been done in different countries, the methods used for this purpose have not been standardized [106]. Therefore, we established and validated a new protocol involving an automated, high-throughput nucleic acid extraction and a PCR-based detection of TBEV RNA in ticks. The described molecular test procedure permits an extensive characterization of the true virus prevalence in natural TBE reservoirs. It is indispensable for investigating the epidemiological situation and predicting endemic foci, and should be implemented in national surveillance systems in any European country where TBE is indigenous.

By screening ticks on the presence of TBEV, we identified a total of 38 endemic foci [90] which do not fully agree with those defined by disease mapping [127]. Evidently, exposure risk assessment based on both disease case mapping and natural (tick) reservoir examinations is incomplete. Geographic mapping of clinical cases depends on correct diagnosis and reporting of symptomatic infections and may further be biased by socio-economic aspects such as variable vaccination rates or dissimilar human outdoor activities in different regions. In contrast, tick surveys give an indication of the true virus prevalence in natural habitats, but data derived from such studies are valid for only the very discrete area and time of investigation. Nevertheless, both approaches importantly contribute to our knowledge on the presence and distribution of TBE foci. Surveillance systems could further be improved by seroprevalence studies of people exposed to ticks. Such examinations are regularly performed in several European countries [106] but have only rarely been considered in Switzerland [199]. Alternatively, biological, process-based models estimating the climatic impact on tick seasonal dynamics may permit predictions on the emergence of new endemic foci [102].

In the present study, we confirmed TBEV activity in areas with no or only sporadic reports of human disease [90, 127]. Whether these regions actually represent new foci of endemicity, however, remains subject of speculation. Although climate change may have favored the emergence of TBE foci [4], a continuing virus circulation in the respective areas cannot be excluded just by the absence of registered disease cases. Instead, TBEV endemicity may have remained undetected as a consequence of subclinical infections or insufficient awareness in supposedly non-endemic regions. This hypothesis is supported by the association of relatively avirulent TBE viruses with recently detected endemic foci [119].

A high proportion of Swiss TBEV analyzed in this work showed a rather low neuropathogenic potential [119]. While such viruses may infect humans relatively harmlessly, the co-circulation of more virulent TBEV variants in established foci ultimately accounts for a total of 110 to 120 annual disease cases in Switzerland [127]. Future research focusing on viruses isolated from human TBE patients will provide important information on the clinical relevance of the different virus variants circulating among the tick population.

Although the E protein is an important determinant of TBEV virulence [29], we could not clearly correlate any individual substitution in this protein with attenuation of virus virulence [119]. This strongly supports the presence of additional determinants of virulence in other genome regions. Further studies will therefore focus on whole genome sequence analyses. These studies will allow for the identification of any mutation possibly affecting the pathogenic potential of Swiss TBEV. Biological significance of these substitutions, however, will require confirmation by cDNA clone studies [43-45].

Taxonomic classification based on the E gene revealed limited geographic clustering, with isolates from four Swiss cantons forming clearly separate lineages [119]. More profound phylogenetic analyses based on whole genome sequences will probably identify additional or alternative lineages. Possibly, TBEV has been transmitted to Switzerland multiple times, involving an independent establishment of different endemic foci. Intensive geographical comparison of virus populations from Switzerland and neighboring countries, preferentially based on full-length sequences, will improve our understanding of the evolutionary dynamics of TBEV.

Taken together, this thesis essentially contributes to an improved mapping and characterization of natural TBE foci in Switzerland and provides a basic characterization of Swiss TBEV. Future work will deepen our understanding of the molecular epidemiology and clinical relevance of the isolated viruses. Furthermore, the unique collection of *Ixodes ricinus* tick samples originating from areas throughout the country enables investigations on any tick-borne pathogen of interest, including species of *Borrelia*, *Rickettsia*, *Francisella*, and *Ehrlichia/Anaplasma*.

8 REFERENCES

1. Dumpis, U., D. Crook, and J. Oksi, *Tick-borne encephalitis*. Clin Infect Dis, 1999. **28**(4): p. 882-90.
2. Charrel, R.N., et al., *Tick-borne virus diseases of human interest in Europe*. Clin Microbiol Infect, 2004. **10**(12): p. 1040-55.
3. Broker, M. and D. Gniel, *New foci of tick-borne encephalitis virus in Europe: consequences for travellers from abroad*. Travel Med Infect Dis, 2003. **1**(3): p. 181-4.
4. Suss, J., *Tick-borne encephalitis in Europe and beyond--the epidemiological situation as of 2007*. Euro Surveill, 2008. **13**(26).
5. Rampas, J. and F. Gallia, *Isolace viru encefalitidy z klíšť' at Ixodes ricinus [Isolation of tick-borne encephalitis virus from ticks Ixodes ricinus]*. Časopis lékařů českých, 1949. **88**: p. 1179-1180.
6. Gallia, F., J. Rampas, and L. Hollender, *[Laboratory infection caused by tick-borne encephalitis virus]*. Čas. Lék. čes., 1949. **88**: p. 224-229.
7. Porterfield, J.S., *The basis of arbovirus classification*. Med Biol, 1975. **53**(5): p. 400-5.
8. Thiel, H.J., et al., *Family Flaviviridae*, in *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature, Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, C.M. Fauquet, et al., Editors. 2005, Elsevier Academic Press: Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford. p. 981-998.
9. Ecker, M., et al., *Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia*. J Gen Virol, 1999. **80** (Pt 1): p. 179-85.
10. Grard, G., et al., *Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy*. Virology, 2007. **361**(1): p. 80-92.
11. Slavik, I., V. Mayer, and E. Mrena, *Morphology of purified tick-borne encephalitis virus*. Acta Virol, 1967. **11**(1): p. 66.
12. Mandl, C.W., *Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis*. Virus Res, 2005. **111**(2): p. 161-74.
13. Chambers, T.J., et al., *Flavivirus genome organization, expression, and replication*. Annu Rev Microbiol, 1990. **44**: p. 649-88.
14. Gritsun, T.S., et al., *Complete sequence of two tick-borne flaviviruses isolated from Siberia and the UK: analysis and significance of the 5' and 3'-UTRs*. Virus Res, 1997. **49**(1): p. 27-39.
15. Proutski, V., et al., *Secondary structure of the 3'-untranslated region of yellow fever virus: implications for virulence, attenuation and vaccine development*. J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 7): p. 1543-9.
16. Proutski, V., E.A. Gould, and E.C. Holmes, *Secondary structure of the 3' untranslated region of flaviviruses: similarities and differences*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(6): p. 1194-202.

17. Gritsun, T.S., V.A. Lashkevich, and E.A. Gould, *Tick-borne encephalitis*. Antiviral Res, 2003. **57**(1-2): p. 129-46.
18. Lindenbach, B.D. and C.A. Rice, *Flaviviridae: The viruses and their replication*; in D.M. Knipe and P.M. Howley (ed.), "Fields Virology", 4th edn., pp. 991-1041. 4 ed. Fields Virology, ed. D.M. Knipe and P.M. Howley. 2001, London, New York & Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins.
19. Yamshchikov, V.F. and R.W. Compans, *Regulation of the late events in flavivirus protein processing and maturation*. Virology, 1993. **192**(1): p. 38-51.
20. Kofler, R.M., F.X. Heinz, and C.W. Mandl, *Capsid protein C of tick-borne encephalitis virus tolerates large internal deletions and is a favorable target for attenuation of virulence*. J Virol, 2002. **76**(7): p. 3534-43.
21. Markoff, L., B. Falgout, and A. Chang, *A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein*. Virology, 1997. **233**(1): p. 105-17.
22. Mackenzie, J., *Wrapping things up about virus RNA replication*. Traffic, 2005. **6**(11): p. 967-77.
23. McMinn, P.C., *The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses*. J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 11): p. 2711-22.
24. Lorenz, I.C., et al., *Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum*. J Virol, 2002. **76**(11): p. 5480-91.
25. Heinz, F.X. and C.W. Mandl, *The molecular biology of tick-borne encephalitis virus*. Review article. APMIS, 1993. **101**(10): p. 735-45.
26. Gritsun, T.S., E.C. Holmes, and E.A. Gould, *Analysis of flavivirus envelope proteins reveals variable domains that reflect their antigenicity and may determine their pathogenesis*. Virus Res, 1995. **35**(3): p. 307-21.
27. Rey, F.A., et al., *The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution*. Nature, 1995. **375**(6529): p. 291-8.
28. Heinz, F.X. and S.L. Allison, *Flavivirus structure and membrane fusion*. Adv Virus Res, 2003. **59**: p. 63-97.
29. Hurrelbrink, R.J. and P.C. McMinn, *Molecular determinants of virulence: the structural and functional basis for flavivirus attenuation*. Adv Virus Res, 2003. **60**: p. 1-42.
30. Crooks, A.J., et al., *The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell*. J Gen Virol, 1994. **75** (Pt 12): p. 3453-60.
31. Gould, E.A., et al., *Neutralizing (54K) and non-neutralizing (54K and 48K) monoclonal antibodies against structural and non-structural yellow fever virus proteins confer immunity in mice*. J Gen Virol, 1986. **67** (Pt 3): p. 591-5.
32. Steffens, S., H.J. Thiel, and S.E. Behrens, *The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family Flaviviridae exhibit similar properties in vitro*. J Gen Virol, 1999. **80** (Pt 10): p. 2583-90.
33. Kroschewski, H., et al., *Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus*. Virology, 2003. **308**(1): p. 92-100.

34. Kopecky, J., et al., *A putative host cell receptor for tick-borne encephalitis virus identified by anti-idiotypic antibodies and virus affinoblotting*. Intervirology, 1999. **42**(1): p. 9-16.
35. Protopopova, E.V., S.N. Konavalova, and V.B. Loktev, *[Isolation of a cellular receptor for tick-borne encephalitis virus using anti-idiotypic antibodies]*. Vopr Virusol, 1997. **42**(6): p. 264-8.
36. Chu, J.J. and M.L. Ng, *Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway*. J Virol, 2004. **78**(19): p. 10543-55.
37. Allison, S.L., et al., *Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH*. J Virol, 1995. **69**(2): p. 695-700.
38. Mansfield, K.L., et al., *Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 8): p. 1781-94.
39. Lorenz, I.C., *Folding, Assembly and Secretion of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Proteins in Mammalian Cells*. PhD Thesis, Institute of Biochemistry, ETH Zürich, Switzerland, 2002: p. 127.
40. Senigl, F., L. Grubhoffer, and J. Kopecky, *Differences in maturation of tick-borne encephalitis virus in mammalian and tick cell line*. Intervirology, 2006. **49**(4): p. 239-48.
41. Frolova, T.V., et al., *[Characteristics of long-term persisting strains of tick-borne encephalitis virus in different forms of the chronic process in animals]*. Vopr Virusol, 1982. **27**(4): p. 473-9.
42. Wallner, G., et al., *Characterization and complete genome sequences of high- and low- virulence variants of tick-borne encephalitis virus*. J Gen Virol, 1996. **77** (Pt 5): p. 1035-42.
43. Mandl, C.W., et al., *Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence strain Hypr*. J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 5): p. 1049-57.
44. Pletnev, A.G., *Infectious cDNA clone of attenuated Langat tick-borne flavivirus (strain E5) and a 3' deletion mutant constructed from it exhibit decreased neuroinvasiveness in immunodeficient mice*. Virology, 2001. **282**(2): p. 288-300.
45. Pletnev, A.G., et al., *Construction and characterization of chimeric tick-borne encephalitis/dengue type 4 viruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10532-6.
46. Holzmann, H., et al., *A single amino acid substitution in envelope protein E of tick-borne encephalitis virus leads to attenuation in the mouse model*. J Virol, 1990. **64**(10): p. 5156-9.
47. Holzmann, H., et al., *Characterization of monoclonal antibody-escape mutants of tick-borne encephalitis virus with reduced neuroinvasiveness in mice*. J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 1): p. 31-7.
48. Mandl, C.W., et al., *Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site*. J Virol, 2000. **74**(20): p. 9601-9.

49. Mandl, C.W., et al., *Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation in vivo*. J Virol, 2001. **75**(12): p. 5627-37.
50. Gritsun, T.S., A. Desai, and E.A. Gould, *The degree of attenuation of tick-borne encephalitis virus depends on the cumulative effects of point mutations*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 7): p. 1667-75.
51. Labuda, M., et al., *Change in phenotype of tick-borne encephalitis virus following passage in Ixodes ricinus ticks and associated amino acid substitution in the envelope protein*. Virus Res, 1994. **31**(3): p. 305-15.
52. Mandl, C.W., et al., *Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses*. Virology, 1989. **173**(1): p. 291-301.
53. Pletnev, A.G., M. Bray, and C.J. Lai, *Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses: effects of mutations on neurovirulence in mice*. J Virol, 1993. **67**(8): p. 4956-63.
54. Holbrook, M.R., et al., *Amino acid substitution(s) in the stem-anchor region of langat virus envelope protein attenuates mouse neurovirulence*. Virology, 2001. **286**(1): p. 54-61.
55. Chambers, T.J., et al., *Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication*. J Virol, 1993. **67**(11): p. 6797-807.
56. Pugachev, K.V., et al., *Site-directed mutagenesis of the tick-borne encephalitis virus NS3 gene reveals the putative serine protease domain of the NS3 protein*. FEBS Lett, 1993. **328**(1-2): p. 115-8.
57. Ruzek, D., et al., *Mutations in the NS2B and NS3 genes affect mouse neuroinvasiveness of a Western European field strain of tick-borne encephalitis virus*. Virology, 2008. **374**(2): p. 249-55.
58. Markoff, L., *5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA*. Adv Virus Res, 2003. **59**: p. 177-228.
59. Mandl, C.W., et al., *Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a flavivirus*. J Virol, 1998. **72**(3): p. 2132-40.
60. Gritsun, T.S., P.A. Nuttall, and E.A. Gould, *Tick-borne flaviviruses*. Adv Virus Res, 2003. **61**: p. 317-71.
61. Gresikova, M. and M. Kaluzova, *Biology of tick-borne encephalitis virus*. Acta Virol, 1997. **41**(2): p. 115-24.
62. Suss, J., *Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines*. Vaccine, 2003. **21 Suppl 1**: p. S19-35.
63. MacLeod, J., *Ixodes ricinus in relation to its physical environment. IV. An analysis of the ecological complexes controlling distribution and activities*. Parasitology, 1936. **28**: p. 295-319.
64. Nahimana, I., et al., *Risk of Borrelia burgdorferi infection in western Switzerland following a tick bite*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2004. **23**(8): p. 603-8.

-
65. Randolph, S.E., *Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors*. Parasitology, 2004. **129 Suppl**: p. S37-65.
 66. Macleod, J., *Ixodes ricinus in relation to its physical environment. II. The factors governing survival and activity*. Parasitology, 1935. **27**: p. 123-144.
 67. Gray, J.S., *The development and seasonal activity of the tick Ixodes ricinus: a vector of Lyme borreliosis*. Rev Med Vet Entomol, 1991. **79**: p. 323-333.
 68. Gray, J.S., *Biology of Ixodes species ticks in relation to tick-borne zoonoses*. Wien Klin Wochenschr, 2002. **114**(13-14): p. 473-8.
 69. Mejlou, H.A. and T.G.T. Jaenson, *Questing behaviour of host-seeking Ixodes ricinus (Acarina: Ixodidae)*. Exp. Appl. Acarol., 1997. **21**: p. 747-754.
 70. Pavlovskij, E.N., *[On natural focality of infectious and parasitic diseases]*. Vestn Akad Nauk SSSR, 1939. **10**: p. 98-108.
 71. Moshkin, M.P., et al., *Epidemiology of a tick-borne viral infection: theoretical insights and practical implications for public health*. Bioessays, 2009. **31**(6): p. 620-8.
 72. Nuttall, P.A., et al., *Adaptations of arboviruses to ticks*. J Med Entomol, 1994. **31**(1): p. 1-9.
 73. Labuda, M., et al., *Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission*. Virology, 1996. **219**(2): p. 357-66.
 74. Danielova, V., et al., *Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus*. Folia Parasitol (Praha), 2002. **49**(4): p. 323-5.
 75. Nuttall, P.A. and M. Labuda, *Dynamics of infection in tick vectors and at the tick-host interface*. Adv Virus Res, 2003. **60**: p. 233-72.
 76. Kozuch, O., et al., *The role of small rodents and hedgehogs in a natural focus of tick-borne encephalitis*. Bull World Health Organ, 1967. **36**: p. Suppl 1:61-6.
 77. Randolph, S.E., et al., *Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis virus*. Parasitology, 1999. **118 (Pt 2)**: p. 177-86.
 78. Randolph, S.E., et al., *Seasonal synchrony: the key to tick-borne encephalitis foci identified by satellite data*. Parasitology, 2000. **121 (Pt 1)**: p. 15-23.
 79. Danielova, V., *Experimental infection of ticks Ixodes ricinus with tick-borne encephalitis virus under different microclimatic conditions*. Folia Parasitol (Praha), 1990. **37**(3): p. 279-82.
 80. Danielova, V., et al., *Influence of microclimatic factors on the development and virus infection rate of Ixodes ricinus L. under experimental conditions*. Folia Parasit, 1983. **30**: p. 153-161.
 81. Randolph, S.E., L. Gern, and P.A. Nuttall, *Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission*. Parasitol Today, 1996. **12**(12): p. 472-9.
 82. Radda, A., H. Hofmann, and C. Kunz, *[Experimentelle Infektion einiger heimischer Säugerarten mit dem Frühsommer Meningoenzephalitis (FSME)]*.

- Virus*. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, 1968. **208**: p. 100-104.
83. Liebisch, A., [Zur Übertragung der Zeckenenzephalitis in der Bundesrepublik Deutschland], in *Beiträge zur Geoökologie der Zentraleuropäischen Zeckenenzephalitis*, H. Jusat, Editor. 1978, Springer-Verlag: Berlin. p. 20-28.
 84. Bakhvalova, V.N., et al., *Natural tick-borne encephalitis virus infection among wild small mammals in the southeastern part of western Siberia, Russia*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2006. **6**(1): p. 32-41.
 85. Gerlinskaya, L.A., et al., [Sexual way of tick-borne encephalitis virus transmission in laboratory mice]. Bull Exp Biol Med, 1997. **123**: p. 327-328.
 86. Klein, S.L., *Parasite manipulation of the proximate mechanisms that mediate social behavior in vertebrates*. Physiol Behav, 2003. **79**(3): p. 441-9.
 87. Alekseev, A.N., et al., *Peculiarities of behaviour of taiga (Ixodes persulcatus) and sheep (Ixodes ricinus) ticks (Acarina: Ixodidae) determined by different methods*. Folia Parasitol (Praha), 2000. **47**(2): p. 147-53.
 88. Suss, J., et al., *TBE incidence versus virus prevalence and increased prevalence of the TBE virus in Ixodes ricinus removed from humans*. Int J Med Microbiol, 2006. **296 Suppl 40**: p. 63-8.
 89. Wikel, S.K., *Host immunity to ticks*. Annu Rev Entomol, 1996. **41**: p. 1-22.
 90. Gaumann, R., et al., *High-throughput procedure for tick surveys of tick-borne encephalitis virus and its application in a national surveillance study in Switzerland*. Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(13): p. 4241-9.
 91. Han, X., et al., *Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus in Ixodes ricinus ticks in Lithuania*. J Med Virol, 2005. **77**(2): p. 249-56.
 92. Suss, J., et al., *Characterization of tick-borne encephalitis (TBE) foci in Germany and Latvia (1997-2000)*. Int J Med Microbiol, 2002. **291 Suppl 33**: p. 34-42.
 93. Cisak, E., et al., *Study on the occurrence of Borrelia burgdorferi sensu lato and tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks collected in Lublin region (eastern Poland)*. Ann Agric Environ Med, 2002. **9**(1): p. 105-10.
 94. Casati, S., L. Gern, and J.C. Piffaretti, *Diversity of the population of Tick-borne encephalitis virus infecting Ixodes ricinus ticks in an endemic area of central Switzerland (Canton Bern)*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 8): p. 2235-41.
 95. Bormane, A., et al., *Vectors of tick-borne diseases and epidemiological situation in Latvia in 1993-2002*. Int J Med Microbiol, 2004. **293 Suppl 37**: p. 36-47.
 96. Alekseev, A.N., H.V. Dubinina, and O.V. Jushkova, *First report on the coexistence and compatibility of seven tick-borne pathogens in unfed adult Ixodes persulcatus Schulze (Acarina: Ixodidae)*. Int J Med Microbiol, 2004. **293 Suppl 37**: p. 104-8.
 97. Romanova, L., et al., *Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation*. Virology, 2007. **362**(1): p. 75-84.

98. Mayer, V. and O. Kozuch, *Study of the virulence of tick-borne encephalitis virus. XI. Genetic heterogeneity of the virus from naturally infectious Ixodes ricinus ticks*. Acta Virol, 1969. **13**(6): p. 469-82.
99. Kaluzova, M., et al., *Reverted virulence of attenuated tick-borne encephalitis virus mutant is not accompanied with the changes in deduced viral envelope protein amino acid sequence*. Acta Virol, 1994. **38**(3): p. 133-40.
100. Ruzek, D., G. Dobler, and O. Donoso Mantke, *Tick-borne encephalitis: Pathogenesis and clinical implications*. Travel Med Infect Dis, 2010.
101. Zanotto, P.M., et al., *An arbovirus cline across the northern hemisphere*. Virology, 1995. **210**(1): p. 152-9.
102. Randolph, S., *Predicting the risk of tick-borne diseases*. Int J Med Microbiol, 2002. **291 Suppl 33**: p. 6-10.
103. Lu, Z., M. Broker, and G. Liang, *Tick-borne encephalitis in mainland China*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2008. **8**(5): p. 713-20.
104. Takashima, I., et al., *A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(8): p. 1943-7.
105. Donoso Mantke, O., et al., *Tick-borne encephalitis virus*, in *Molecular detection of human viral pathogens*, D. Liu, Editor. 2010, Taylor & Francis Group: Great Britain. p. 271-282.
106. Donoso Mantke, O., R. Schadler, and M. Niedrig, *A survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries*. Euro Surveill, 2008. **13**(17).
107. Fomsgaard, A., C. Christiansen, and R. Bodker, *First identification of tick-borne encephalitis in Denmark outside of Bornholm, August 2009*. Euro Surveill, 2009. **14**(36).
108. Kunze, U., *12th ISW-TBE Newsletter*, in *12th Annual ISW-TBE Meeting*. 2010: Vienna.
109. Jaenson, T.G., et al., *Geographical distribution, host associations, and vector roles of ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) in Sweden*. J Med Entomol, 1994. **31**(2): p. 240-56.
110. Nuttall, P.A. and M. Labuda, *Tick-borne encephalitides*, in *Zoonoses*, S.R. Palmer, L. Soulsby, and D.I.H. Simpson, Editors. 1998, Oxford University Press: Oxford. p. 469-86.
111. Golovljova, I., et al., *Characterization of tick-borne encephalitis virus from Estonia*. J Med Virol, 2004. **74**(4): p. 580-8.
112. Haglund, M., et al., *Characterisation of human tick-borne encephalitis virus from Sweden*. J Med Virol, 2003. **71**(4): p. 610-21.
113. Jaaskelainen, A.E., et al., *Siberian subtype tickborne encephalitis virus, Finland*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(10): p. 1568-71.
114. Kim, S.Y., et al., *Isolation of tick-borne encephalitis viruses from wild rodents, South Korea*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2008. **8**(1): p. 7-13.
115. Guirakhoo, F., et al., *Evidence for antigenic stability of tick-borne encephalitis virus by the analysis of natural isolates*. J Gen Virol, 1987. **68 (Pt 3)**: p. 859-64.

116. Heinz, F.X. and C. Kunz, *Homogeneity of the structural glycoprotein from European isolates of tick-borne encephalitis virus: comparison with other flaviviruses*. J Gen Virol, 1981. **57**(Pt 2): p. 263-74.
117. Heinz, F.X. and C. Kunz, *Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: peptide mapping of large non-structural proteins of European isolates and comparison with other flaviviruses*. J Gen Virol, 1982. **62** (Pt 2): p. 271-85.
118. Golovljova, I., et al., *Unique signature amino acid substitution in Baltic tick-borne encephalitis virus (TBEV) strains within the Siberian TBEV subtype*. Int J Med Microbiol, 2008. **298**(Suppl.1): p. 108-120.
119. Gaumann, R., et al., *Phylogenetic and Virulence Analysis of Tick-Borne Encephalitis Virus Field Isolates from Switzerland*. Manuscript submitted to J Med Virol, 2010. **August 24**.
120. Skarpaas, T., et al., *Tickborne encephalitis virus, Norway and Denmark*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(7): p. 1136-8.
121. Cook, S. and E.C. Holmes, *A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: Flaviviridae) and the evolution of vector transmission*. Arch Virol, 2006. **151**(2): p. 309-25.
122. Alekseev, A.N. and S.P. Chunikhin, *[The experimental transmission of the tick-borne encephalitis virus by ixodid ticks (the mechanisms, time periods, species and sex differences)]*. Parazitologiya, 1990. **24**(3): p. 177-85.
123. Korenberg, E.I. and Y.V. Kovalevskii, *Main features of tick-borne encephalitis eco-epidemiology in Russia*. Zentralbl Bakteriell, 1999. **289**(5-7): p. 525-39.
124. Korenberg, E.I. and V. Kovalevskii Yu, *Variation in parameters affecting risk of human disease due to TBE virus*. Folia Parasitol (Praha), 1995. **42**(4): p. 307-12.
125. ISW-TBE. *International Scientific Working Group on TBE; detailed statistics on the epidemiology of TBE*. 2010; Available from: <http://www.tbe-info.com>.
126. Spiess, H., et al., *[Zentraleuropäische Enzephalitis (Zeckenenzephalitis) in der Schweiz]*. Schweiz Med Wochenschr, 1969. **99**: p. 277-282.
127. FOPH. *Federal Office for Public Health: Infectious Diseases - Information on tick-borne encephalitis* 2010; Available from: <http://www.bag.admin.ch/themen/medizin/00682/00684/01114/index.html?lang=de>.
128. Gray, J.S., *Ixodes ricinus seasonal activity: implications of global warming indicated by revisiting tick and weather data*. Int J Med Microbiol, 2008. **298**(SI): p. 19-24.
129. Randolph, S.E., et al., *Variable spikes in tick-borne encephalitis incidence in 2006 independent of variable tick abundance but related to weather*. Parasit Vectors, 2008. **1**(1): p. 44.
130. Danielova, V., et al., *Influence of climate warming on tickborne encephalitis expansion to higher altitudes over the last decade (1997-2006) in the Highland Region (Czech Republic)*. Cent Eur J Public Health, 2008. **16**(1): p. 4-11.
131. Sumilo, D., et al., *Climate change cannot explain the upsurge of tick-borne encephalitis in the Baltics*. PLoS One, 2007. **2**(6): p. e500.

132. Sumilo, D., et al., *Socio-economic factors in the differential upsurge of tick-borne encephalitis in Central and Eastern Europe*. Rev Med Virol, 2008. **18**(2): p. 81-95.
133. Sumilo, D., et al., *Behavioural responses to perceived risk of tick-borne encephalitis: vaccination and avoidance in the Baltics and Slovenia*. Vaccine, 2008. **26**(21): p. 2580-8.
134. Waldenstrom, J., et al., *Migrating birds and tickborne encephalitis virus*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(8): p. 1215-8.
135. Gunther, G. and L. Lindquist, *Surveillance of tick-borne encephalitis in Europe and case definition*. Euro Surveill, 2005. **10**(1): p. 2-3.
136. Kunze, U., *Conference report of the 10th meeting of the international scientific working group on tick-borne encephalitis (ISW-TBE): combating tick-borne encephalitis: vaccination rates on the rise*. Vaccine, 2008. **26**(52): p. 6738-40.
137. Federal. *Infectious Diseases - Information on tick-borne encephalitis*. 2010; Available from: <http://www.bag.admin.ch/themen/medizin/00682/00684/01114/index.html?lang=de>.
138. Labuda, M., et al., *Tick-borne encephalitis virus foci in Slovakia*. Int J Med Microbiol, 2002. **291 Suppl 33**: p. 43-7.
139. Suss, J., et al., *Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany--epidemiological data, development of risk areas and virus prevalence in field-collected ticks and in ticks removed from humans*. Int J Med Microbiol, 2004. **293 Suppl 37**: p. 69-79.
140. Nuttall, P.A. and M. Labuda, *Tick-host interactions: saliva-activated transmission*. Parasitology, 2004. **129 Suppl**: p. S177-89.
141. Gresikova, M. and J. Rehacek, *[Isolierung der Zeckenencephalitis aus Blut und Milch von Haustieren (Schaf und Kuh) nach Infektion durch Zecken der Gattung Ixodes ricinus L.]*. Arch. ges. Virusforsch., 1959. **9**: p. 360-364.
142. Shapoval, A.N., *The Prophylaxis of Tick-Borne Encephalitis*. Medicine, Moscow, 1977. **47**.
143. Pogodina, V.V., *The resistance of tick-borne encephalitis virus to the effects of gastric juice*. Vopr. Virusol., 1958. **3**: p. 259-299.
144. Avsic-Zupanc, T., et al., *Laboratory acquired tick-borne meningoencephalitis: characterisation of virus strains*. Clin Diagn Virol, 1995. **4**(1): p. 51-9.
145. Scherer, W.F., et al., *Laboratory safety for arboviruses and certain other viruses of vertebrates*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1980. **29**: p. 1359-1381.
146. Gould, E.A., *Virus cryopreservation and storage*. Meth. Mol. Biol., 1995. **38**: p. 7-20.
147. Chambers, T.J. and M.S. Diamond, *Pathogenesis of flavivirus encephalitis*. Adv Virus Res, 2003. **60**: p. 273-342.
148. Kim, K.S., *Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(5): p. 376-85.
149. Malkova, D. and V. Frankova, *The lymphatic system in the development of experimental tick-borne encephalitis in mice*. Acta Virol, 1959. **3**: p. 210-4.

150. Monath, T.P. and F.X. Heinz, *Flaviviruses*, in *Fields Virology*, B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley, Editors. 1996, PA: Lippincott-Raven: Philadelphia. p. 961-1034.
151. Monath, T.P., *Pathobiology of the flaviviruses; in S. Schleisinger and M.J. Schleisinger (ed.), "The Togaviridae and Flaviviridae", pp. 375-440. The Togaviridae and Flaviviridae*, ed. S. Schlesinger and M.J. Schleisinger. 1986, Plenum, New York: Plenum.
152. Toporkova, M.G., et al., *Serum levels of interleukin 6 in recently hospitalized tick-borne encephalitis patients correlate with age, but not with disease outcome*. Clin Exp Immunol, 2008. **152**: p. 517-521.
153. Malkova, D. and V. Frankova, *The lymphatic system in the development of experimental tick-borne encephalitis in mice*. Acta Virol, 1959. **3**(2): p. 210-214.
154. Albrecht, P., *Pathogenesis of experimental infection with tick-borne encephalitis virus*, in *Biology of Viruses of the Tick-Borne Encephalitis Complex*, H. Libikova, Editor. 1962, Academic Press: New York. p. 247-257.
155. Haglund, M. and G. Gunther, *Tick-borne encephalitis pathogenesis, clinical course and long-term follow-up*. Vaccine, 2003. **21**(Suppl 1): p. 11-18.
156. Monath, T.P., C.B. Cropp, and A.K. Harrison, *Mode of entry of a neurotropic arbovirus into the central nervous system: Reinvestigation of an old controversy*. Lab. Invest., 1983. **48**(4): p. 399-410.
157. Hofmann, H., *[Die unspezifische Abwehr bei neurotrophen Arbovirusinfektionen]*. Zbl. Bakt. Hyg., 1973. **223**(I. Abt. Orig. A): p. 143-163.
158. Malkova, D. and O. Filip, *Histological picture in the place of inoculation and in lymph nodes of mice after subcutaneous infection with tick-borne encephalitis virus*. Acta Virol, 1968. **8**: p. 10-13.
159. Gelpi, E., et al., *Inflammatory response in human tick-borne encephalitis: analysis of postmortem brain tissue*. J Neuro Virol, 2006. **12**(322-327).
160. Isaeva, M.P., et al., *[Apoptosis as a mechanism for the cytopathic action of tick-borne encephalitis virus]*. Vopr Virusol, 1998. **43**: p. 182-186.
161. Ruzek, D., et al., *Morphological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 7): p. 1649-58.
162. Kamalov, N.I., et al., *[The morphological characteristics of cell death in different forms of acute tick-borne encephalitis]*. Morfologia, 1998. **114**: p. 54-58.
163. Hayasaka, D., et al., *Mortality following peripheral infection with Tick-borne encephalitis virus results from a combination of central nervous system pathology, systemi inflammatory and stress responses*. Virology, 2009. **390**: p. 139-150.
164. Mazlo, M. and J. Szanto, *Morphological demonstration of the virus of tick-borne encephalitis in the human brain*. Acta Neuropathol (Berl), 1978. **43**: p. 251-253.
165. King, N.J., et al., *Immunopathology of flavivirus infections*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(1): p. 33-42.

166. Lotric-Furlan, S. and F. Strle, *Thrombocytopenia, leukopenia and abnormal liver function tests in the initial phase of tick-borne encephalitis*. Zentralbl Bakteriол, 1995. **282**: p. 275.
167. Malkova, D., F. Pala, and Z. Sidak, *Cellular changes in the white cell count, regional lymph node and spleen during infection with tick-borne encephalitis virus in mice*. Acta Virol, 1961. **5**: p. 101-111.
168. Kaiser, R., *Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany and clinical courses of the disease*. Int J Med Microbiol, 2002. **291**(Suppl.): p. 58-61.
169. Holub, M., et al., *Lymphocyte subset numbers in cerebrospinal fluid: comparison of tick-borne encephalitis and neuroborreliosis*. Acta Neurol Scand, 2002. **106**: p. 302-308.
170. Gunther, G., et al., *Intrathecal IgM, IgA and IgG antibody response in tick-borne encephalitis*. Clin Diagn Virol, 1997. **8**: p. 17-29.
171. Holzmann, H., *Diagnosis of tick-borne encephalitis*. Vaccine, 2003. **21**: p. S36-S40.
172. Atrasheuskaya, A.V., T.M. Fredeking, and G.M. Ignatyev, *Changes in immune parameters and their correction in human cases of tick-borne encephalitis*. Clin Exp Immunol, 2003. **131**: p. 148-154.
173. Gruol, D.L. and T.E. Nelson, *Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system*. Mol Neurobiol, 1997. **15**: p. 307-339.
174. Marz, P., U. Otten, and S. Rose-John, *Neuronal activities of IL-6 type cytokines often depend on soluble cytokine receptors*. Eur J Neurosci, 1999. **11**: p. 2995-3004.
175. Lepej, S.Z., et al., *Chemokines CXCL10 and CXCL11 in the cerebrospinal fluid of patients with tick-borne encephalitis*. Acta Neurol Scand, 2007. **115**: p. 109-114.
176. Grygorczuk, S., et al., *[Concentration of the beta-chemokine CCL5 (RANTES) in cerebrospinal fluid in patients with tick-borne encephalitis]*. Neurol Neurochir Pol, 2006. **40**: p. 106-111.
177. Michalowska-Wender, G., et al., *[Evaluation of soluble platelet cell adhesion molecule sPECAM-1 and chemokine MCP-1 (CCL2) concentration in CSF of patients with tick-borne encephalitis]*. Pol Merkur Lekarski, 2006. **20**: p. 46-48.
178. Glimaker, M., P. Olcén, and B. Andersson, *Interferon- γ in cerebrospinal fluid of patients with viral and bacterial meningitis*. Scand J Infect Dis, 1994. **26**: p. 141-147.
179. Gelpi, E., et al., *Visualization of Central European tick-borne encephalitis infection in fatal human cases*. J Neuropathol Exp Neurol, 2005. **64**(6): p. 506-12.
180. Ruzek, D., et al., *CD8⁺ T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis*. Virology, 2009. **384**(1): p. 1-6.
181. Licon Luna, R.M., et al., *Lack of both Fas ligand and perforin protects from flavivirus-mediated encephalitis in mice*. J Virol, 2002. **76**(7): p. 3202-3211.

182. Votiakov, V.I., V.I. Zlobin, and N.P. Mishayeva, [*Tick-borne encephalitis in Eurasia. Ecology, molecular epidemiology, nosology, evolution*]. 2002, Novosibirsk, Russia: Nauka.
183. Shapoval, A.N., *Chronic Forms of Tick-Borne Encephalitis*. Medicine, Leningrad, 1976: p. 175.
184. Gustafson, R., et al., *Two-year survey of the incidence of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in a high-risk population in Sweden*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1992. **11**: p. 894-900.
185. Kaiser, R., *The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-1998*. Brain, 1999. **122**: p. 2067-2078.
186. Kaiser, R., *Tick-borne encephalitis*. Infect Dis Clin North Am, 2008. **22**: p. 561.
187. Kunz, C., et al., *Monograph: Tick-borne encephalitis (TBE, FSME); project number BS-VA-007*, ed. A.C. Gruber. 2007, Vienna, Austria: Baxter AG.
188. Votiakov, V.I., I.I. Protas, and V.M. Zhdanov, [*Western Tick-Borne Encephalitis*]. Belarus, Minsk, 1978: p. 256.
189. Schwaiger, M. and P. Cassinotti, *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**(2): p. 136-45.
190. Sakasida, A., et al., *The importance of tick-borne encephalitis virus RNA detection for early differential diagnosis of tick-borne encephalitis*. J Clin Virol, 2005. **33**: p. 331-335.
191. Puchhammer-Stockl, E., et al., *Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay*. Clin Diagn Virol, 1995. **4**(4): p. 321-6.
192. Tomazic, J., et al., *Tick-borne encephalitis: possibly a fatal disease in its acute stage. PCR amplification of TBE RNA from postmortem brain tissue*. Infection, 1997. **25**(1): p. 41-43.
193. Cinque, P., S. Bossolasco, and A. Lundkvist, *Molecular analysis of cerebrospinal fluid in viral diseases of the central nervous system*. J Clin Virol, 2003. **26**: p. 1-28.
194. Leonova, G.N., et al., *Evaluation of vaccine Encepur® Adult for induction of human neutralizing antibodies against recent Far Eastern subtype strains of tick-borne encephalitis*. Vaccine, 2007. **25**: p. 895-901.
195. Heinz, F.X., et al., *Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis*. Vaccine, 2007. **25**(7559-7567).
196. Heininger, U., *Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) - nur die komplette Impfserie schützt zuverlässig*. ARS Medici, 2006. **17**: p. 801-804.
197. Arras, C., R. Fesharek, and J.P. Gregersen, *Do specific hyperimmunoglobulins aggravate clinical course of tick-borne encephalitis?* Lancet, 1996. **347**: p. 1331.
198. Waldvogel, K., et al., *Severe tick-borne encephalitis following passive immunization*. Eur J Pediatr, 1996. **155**: p. 775-779.

199. Matile, H., et al., [*The transmission of tick-borne encephalitis in Switzerland. an attempt at establishing a register of natural reservoirs for a seroepidemiologic examination of forest personnel in the middle of the country*]. Schweiz Med Wochenschr, 1981. **111**(35): p. 1262-1269.

9 APPENDIX

During the past several years, an increasing awareness of tick-transmitted pathogens has been observed amongst the general public. Media such as the internet, television, radio, and newspapers play a major role in advising the public of the potential risk of tick bites, in informing about protection and disease prevention, and in communicating recent findings such as the identification of new risk areas of tick-borne diseases.

In the national screening study performed in the framework of this PhD project, new regions at risk of TBE could be identified. Our data importantly add to an improved risk assessment of TBE in Switzerland, which is generally based on geographic mapping of clinical cases done by the FOPH. The results of the study, but also the realization of the tick collection, were therefore revealed to the press.

The official press releases in spring 2009 (tick collection) and spring 2010 (study results), respectively, resulted in the publication of numerous online and newspaper articles, various radio shows with interviews, and three television reports with my personal participation (“Tagesschau”, “Schweiz aktuell”, “Tele Top Spezial”). Furthermore, the findings of the study were published on the SPIEZ LABORATORY homepage (www.labor-spiez.ch). Although far from being complete, this appendix exemplarily enlists some of the newspaper articles on both the tick collection activities and the screening results. Also, the fact sheet including the risk map and the table with estimated prevalences of all 165 collection sites, available for download at the SPIEZ LABORATORY homepage, is included.

All articles were downloaded from <http://www.argus.ch>. “ARGUS der Presse AG” is Switzerland’s leading supplier of media monitoring services in the field of print media, radio and television, and the internet.

Examples of newspaper articles on tick collection

21.04.2009	Berner Zeitung	„Kampf den Zecken“
23.04.2009	Berner Oberländer	„Armeeangehörige jagen Zecken“
23.04.2009	Die Südostschweiz, Issue „Gaster und See“	„Der Bund sammelt Zecken im Joner Wald“
24.04.2009	Allgemeiner Anzeiger	„Das Militär spürt Zecken auf“
28.04.2009	Sarganserländer	„Zeckensammler im Sarganserland aktiv“
06.05.2009	Die Südostschweiz, Issue „Glarus“	„WK-Soldaten fahnden im Glarnerland nach Zecken“
08.05.2009	Tages-Anzeiger Zürich	„Die Armee auf der Jagd nach neuen Feinden: Zecken“
14.05.2009	Glarus Nord Anzeiger	„Zecken machen vor Glarnerland nicht halt“
29.06.2009	Der Landbote	„Auf der Jagd nach 400 Zecken“

BERNER ZEITUNG **BZ**

LABOR SPIEZ

Kampf den Zecken

Zecken können schlimme Krankheiten verursachen. Jetzt wollen die Behörden mehr wissen über die Verbreitung.

An 200 Standorten in der ganzen Schweiz werden vom 22. April bis 6. Mai Zecken eingesammelt. Die Behörden wollen sich damit eine Übersicht über die Verbreitung der Viren verschaffen, die im Frühsommer zur Zecken-Hirnhautentzündung führen können.

Durchgeführt wird die Zeckensammlung von Spezialisten der ABC-Abwehr-Truppen und von Mitarbeitern des Labors

Spiez. Am Projekt beteiligt sind auch das Institut für Infektionskrankheiten der Universität Bern und das Zoologische Institut der Universität Neuenburg.

Die Zecken werden gesammelt, indem über den Boden und die tiefe Vegetation grosse Tücher gestreift werden, an denen sich die Tiere festhalten. Erste Resultate zur epidemiologischen Situation sind im kommenden Herbst zu erwarten, wie das Verteidigungsdepartement VBS gestern mitteilte.

Die Zecke saugt in jedem Entwicklungsstadium Blut und kann damit zahlreiche gefährliche Krankheiten übertragen.

Die bekanntesten dieser Krankheiten sind die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) und die Borreliose. Ein Viertel bis die Hälfte der Zecken sind Träger von Borrelien. Mit dem FSME-Virus sind hingegen nur 0,5 bis 3 Prozent infiziert. **SDA**

BERNER OBERLÄNDER

LABOR SPIEZ ARBEITET MIT DEN UNIVERSITÄTEN

BERN UND NEUENBURG ZUSAMMEN

Armeeangehörige jagen Zecken



Mit einem weissen Frotteetuch streift Soldat Renaud Desgraz durchs Unterholz. Kamerad Philipp Meier hält Pinzette und Reagenzgläser bereit. Zecken, die sich am Tuch festhalten, werden von ihm abgepflückt und hinter Glas gebracht.

Markus Lüthi

Das Militär im Sondereinsatz: 20 Angehörige der Armee Sammeln derzeit an 197 Orten in der Schweiz Zecken ein. Wir haben die Mikrobiologin Rahel Gäumann bei der speziellen Aktion in der Nähe des Labors Spiez begleitet.

Anfang Juli 2008 griffen Zecken des Nachts in einem Risikogebiet im zürcherischen Ossingen biwakierende Soldaten an. 48 Armeeangehörige wurden gestochen – sämtliche Medien berichteten über den «Skandal». Jetzt dreht die Armee den Spiess um: Sie schickt 20 ihrer Leute im Tarnanzug auf Zeckenjagd. Spezialisten der ABC-Abwehr-Truppen sowie Mitarbeiter des Labors Spiez führen in Zusammenarbeit mit den Universitäten Bern und Neuenburg eine Zeckensammlung durch. Rund 80 000 Zecken sollen gefangen werden – zu Untersuchungszwecken.

Gefroren und zermalm

Die achtbeinigen Blutsauger werden später zu je zehn Stück bei minus 80 Grad eingefroren und zermalm. Mikrobiologische Untersuchungen an der so entstandenen Flüssigkeit sollen dann zeigen, ob die Zecken Träger der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) sind. Das Virus, welches beim Menschen Hirnhautentzündung verursacht, wird über genetische Informationen eruiert.

Es handelt sich um ein Projekt des Labors Spiez, in dessen Rahmen die Mikrobiologin Rahel Gäumann vom Institut für Infektionskrankheiten der Uni Bern ihre Dissertation erarbeitet. «Jährlich werden in der Schweiz 100 bis 150 FSME-Erkrankungen gemeldet. Im Jahr

2006 wurde eine Spitze von 256 Fällen registriert. Das zeigt, der Erreger ist eine potenzielle Bedrohung», erklärt die 25-jährige Forscherin. Man geht davon aus, dass 0,5 bis 3 Prozent der Zecken den Hirnhautentzündungserreger in sich tragen. Bei den meisten gestochenen Menschen verläuft die Ansteckung ohne Symptome. Bei 15 Prozent der Infizierten wird das zentrale Nervensystem befallen. Rund 1 Prozent der Betroffenen stirbt an den Folgen.

Virusdichte eruieren

Auf Grund dieser Krankheitsdaten wurden bisher Gefahrenkarten mit FSME-Risikogebieten erstellt. Gäumann will jetzt eine Zeckenverbreitungskarte erstellen. «Dabei steht nicht die Zahl der vorkommenden Zecken im Vordergrund, sondern der Prozentsatz der gefährlichen Virus-träger», sagt die Frau aus Unterlangenegg.

Im Gegensatz zu den umliegenden Ländern bestehen solche Erhebungen in der Schweiz bisher nicht flächendeckend. An 197 Standorten werden bis zum 6. Mai Zecken gesammelt. Darunter figurieren sowohl Gebiete, aus denen Krankheitsfälle gemeldet wurden, wie auch andere. Im Kanton Bern wird in Aarberg, Aarwangen, Bern, Busswil bei Büren, Erlenbach, Fraubrunnen, Gampelen, Köniz, Münsingen, Moutier, Nidau, Reichenbach, Saint-Imier, Spiez, Unterseen und Wynigen gesammelt.

Keine Friedensfahne

Obwohl die Soldaten mit einem weissen, an einer Stange befestigten Frotteetuch unterwegs sind, handelt es sich dabei nicht um eine Friedensfahne. Es ist auch keine neue Art des Fahnenmarsches. «Die Soldaten streifen mit dem Tuch durchs Unterholz, und die von den Pflanzen im

Mischwald abgestreiften Zecken halten sich daran fest. Mit Pinzetten werden sie dann herausgeklaut und in Reagenzgläsern versorgt», schildert Gäumann das Vorgehen. Im Glas ist etwas Gras, damit die Tierchen nicht vertrocknen. Diese sind äusserst robust und können von Hand kaum zerdrückt werden.

Die Armeeangehörigen haben ihre Hosenbeine an den Stiefeln festgeklebt, damit die Zecken dort keinen Einschlupf finden. Nach erfolgter Jagd duschen sich die Sammler und suchen den Körper gründlich nach allfälligen Blutsaugern ab.

Gegen FSME geimpft

Gegen das FSME-Virus besteht eine Impfung, welche in drei Teilen per Spritze in den Oberarm verabreicht wird. Sämtliche Sammler sind denn auch geimpft. Zecken verbreiten aber auch noch andere Krankheitserreger. Am häufigsten ein Bakterium, welches die Lyme-Borreliose verursacht. Schweizweit erkranken an dieser jährlich zwischen 3000 und 5000 Leute. Diese Zahl ist geschätzt, da im Gegensatz zur Hirnhautentzündung keine Meldepflicht besteht. Gegen die Borreliose gibt es keinen Impfschutz. Früh erkannt, kann die Krankheit aber mittels Antibiotika geheilt werden. Unerkannt oder zu spät behandelt, führt sie zu schweren Behinderungen und Invalidität.

Haben die Soldaten, welche ihren Wiederholungskurs heuer den winzigen Blutsaugern widmen, keine Angst? «Überhaupt nicht. Ich stamme aus St. Gallen. Obschon es dort auch Zecken gibt, gehe ich regelmässig Joggen und wurde noch nie gestochen», sagt Johannes Haugstetter. «Hier gehen wir zudem einer sinnvollerer Tätigkeit nach als auch schon.»

Resultate im Herbst

Rahel Gäumann hofft, im Herbst erste Resultate der Studie präsentieren zu können: «Es wird eine Momentaufnahme sein, da sich die Situation laufend verändert. Nicht zuletzt wegen der sich verändernden Umweltbedingungen breiten sich die Zecken immer weiter aus.»

Nebst dem Wissen um die Gefährlichkeit der Winzlinge sei das Reagieren nach einem verdächtigen Stich wichtig: «Der FSME-Erreger wird beim Stich über den Speichel sofort übertragen. Borreliose-Erreger sitzen im Mitteldarm der Zecken – eine Übertragung auf den Menschen

dauert hier 12 bis 24 Stunden.» Bei auffälligen Reaktionen und Symptomen ist die Konsultation eines Arztes angebracht.

PETER ROTHACHER

• www.zecken.ch



Die Mikrobiologin Rahel Gäumann zeigt hier nicht die Grösse einer Zecke, sondern erklärt gestenreich ihr Tun.

Markus Hubacher



Eine Zecke auf Rahel Gäumanns Fingernagel.

Markus Hubacher

DIE SÜDOSTSCHWEIZ
AUSGABE GASTR UND SEE

Der Bund sammelt Zecken im Joner Wald

Zwei rund 100 Quadratmeter grosse Gebiete in Oberböllingen und Wagen werden untersucht.

Von Matthias Hobi

Rapperswil-Jona. – Schweizweit werden vom 22. April bis 6. Mai an rund 200 Standorten Zecken gesammelt. «Ziel der Studie ist, die Infektionsrate der Zecken zu untersuchen», sagt Rahel Gäumann, Virologin und Koor-

dinatorin der Studie. Konkret will die Expertin untersuchen, wieviele Prozent der gesammelten Exemplare die Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME) oder die Lyme-Borreliose in sich tragen. Über die Anzahl der Zecken in einer bestimmten Region wird die Studie laut Gäumann keine Schlüsse erlauben.

Resultate gibts im Herbst

Der genaue Sammeltermin steht noch nicht fest, da die Zeckensammler auf trockene Witterung angewiesen sind.

Laut der Virologin wurden Wagen und Oberböllingen ausgesucht, weil aus diesen Gebieten eine hohe Zeckenverbreitung sowie eine grosse Anzahl von Krankheitsfällen gemeldet wurden. Gesammelt werden die Zecken von Spezialisten der ABC Abwehrtruppen der Armee und Mitarbeitern des Labor Spiez. Die gesammelten Insekten werden in Reagenzgläser verpackt, eingefroren und von Gäumann untersucht. Erste Resultate der Studie sollen im Herbst bekanntgegeben werden.

BERICHT SEITE 3

Allgemeiner Anzeiger

Das Militär spürt Zecken auf

SCHWEIZ | Wenn man in den kommenden zwei Wochen Spezialisten der Armee in Schutzkleidern beim Ausbreiten und Einrollen von grossen weissen Tüchern sieht, so üben sie nicht etwa die Kapitulation mit der sprichwörtlichen «weissen Fahne». Sie sind den Zecken auf der Spur.

An 200 Standorten in der ganzen Schweiz werden vom 22. April bis 6. Mai Zecken eingesammelt. Die Behörden wollen sich damit eine Übersicht über die Verbreitung der Viren verschaffen, die im Frühsommer zur Zecken-Hirnhautentzündung führen können. Durchgeführt wird die Zeckensammlung von Spezialisten der ABC (Atom-Biologisch-Chemisch)-Abwehr-Truppen und von Mitarbeitern des VBS-eigenen «Labor Spiez». Geht man von der biologischen Komponente der Aktion aus, so handelt es sich durchaus um einen Ernstfall-Einsatz. Am

Projekt beteiligt sind auch das Institut für Infektionskrankheiten der Uni Bern und das Zoologische Institut der Universität Neuenburg.

Träger von Krankheiten

Die Zecken werden gesammelt, indem über den Boden und die tiefe Vegetation grosse Tücher gestreift werden, an denen sich die Tiere festhalten. Erste Resultate zur epidemiologischen Situation sind im kommenden Herbst zu erwarten, wie das Verteidigungsdepartement VBS mitteilte. Die Zecke saugt in jedem Entwicklungsstadium Blut und kann damit zahlreiche gefährliche Krankheiten übertragen. Die bekanntesten dieser Krankheiten sind die Frühsommer-Meningoenzephalitis FSME und die Borreliose. Ein Viertel bis die Hälfte der Zecken sind Träger von Borrelien. Mit dem gefährlicheren FSME-Virus sind hingegen nur 0,5 bis 3 Prozent infiziert.

pd/wie.

Sarganserländer

Zeckensammler im Sarganserland aktiv

Mels/Walenstadt. – Im Rahmen einer Studie zur epidemiologischen Situation der Zecken-Hirnhautentzündung in der Schweiz (Frühsommer-Meningoenzephalitis FSME) wird derzeit eine Verbreitungskarte der Viren basierend auf der tatsächlichen Infektionsrate von Zecken erstellt. Die Basis für die Untersuchungen bildet eine Zeckensammlung an 200 Standorten in der ganzen Schweiz. Die Sammlung findet in diesen Tagen statt und wird von Spezialisten der ABC-Abwehr-Truppen sowie Mitarbeitern des Labor Spiez durchgeführt. Wie Rahel Gäumann, Virologin und Koordinatorin der Studie auf Anfrage des «Sarganserländers» bestätigte, werden auch in Mels und Walenstadt Zecken gesammelt. Diese Orte habe man ausgewählt, weil aus ihnen in den letzten 20 Jahren fünf FSME-Fälle gemeldet worden seien. (rv/pd)

DIE SÜDOSTSCHWEIZ
AUSGABE GLARUS

WK-Soldaten fahnden im Glarnerland nach Zecken



Auf Zeckenjagd: Mit einer Art Fahne aus Leintuch durchkämmt dieser WK-Soldat die Wiese.

Auf keiner Zeckenkarte ist das Glarnerland als Risikogebiet markiert. Zeckenexperte Norbert Satz klärt auf: Auch im Zigerschlitz ist ein Risiko vorhanden. Aufgrund einer Studie waren gestern fünf Zeckensammler zu Besuch.

Von Noemi Mathis

Glarus. – Gestern waren fünf WK-Soldaten in Linthal, Hätzingen, Ennenda und Mollis auf ihrer Mission «Zeckensammlung» unterwegs.

Schweizweit wurden zwischen dem 22. April und dem 6. Mai an rund 200 Standorten Zecken gesammelt. «Ziel der Studie ist, die Infektionsrate der Zecken zu untersuchen», erklärt Rahel Gämman, Virologin und Koordinatorin der Studie.

Die Expertin will so feststellen, wieviel Prozent der gesammelten Exemplare die Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME) oder die Lyme-Borreliose in sich tragen. Die Anzahl Zecken in einer Region wird mit der Studie laut Gämman nicht erhoben.

Zeckensammler nun im Glarnerland
Gesammelt werden die Zecken von Spezialisten der ABC-Abwehr-Truppen der Armee und Mitarbeitern des Labors des Bundesamtes für Bevölkerungsschutz in Spiez. «Die Tierchen sammeln wir in Reagenzgläsern und schicken sie zur Untersuchung», erklärt Matthias Truttmann, Leiter der Sammel-Truppe im Glarnerland.

Zuerst waren die WK-Soldaten in Linthal im Einsatz: Mit fahnenähnlichen Leintüchern durchkämmten sie niedrige Graswiesen und ausgewählte Waldteile. «Die Zecken klammern sich automatisch am Stoff fest», schildert Truttmann. In jedem Standort müssten mindestens 400 Zecken gesammelt werden, um die Angaben statistisch verwenden zu können.

Kein Erfolg in Hätzingen und Mollis

In Linthal sei das Ergebnis nicht besonders ergiebig gewesen: «Wir haben nur 173 Zecken gesammelt.» Dies könne jedoch auf die schlechten Wetterverhältnisse zurückzuführen sein. «Ideal wäre, wenn es 24 Stunden vor dem Sammeln trocken bleibt», sagt Truttmann. So kämen die Zecken aus ihren Verstecken. Trockene Wiesen würden auch das Leintuch nicht so schnell durchnässen.

Auch in Hätzingen und Mollis ist das Ergebnis erfolglos ausgefallen: In Hätzingen hat man lediglich 8, in Mollis 24 Zecken gefunden. «Es muss nun entschieden werden, ob der zweite WK im August noch einmal ins Glarnerland kommt», sagt Truttmann. Das Ganze werde jedoch vom Labor Spiez koordiniert. Es könne sein, dass zu einem anderen Zeitpunkt Spezialisten aus dem Labor selber weitere Zecken holen.

Glarnerland doch Risikogebiet

Anders zu und her ging es in Ennen-

da: Schnell hatten die fünf Sammler 495 Zecken von den Tüchern gepflückt. Wieviele dieser Tierchen den Virus in sich tragen, wird erst im Herbst bekannt gegeben.

Laut dem Zürcher Zeckenexperten Norbert Satz kann man das Glarnerland durchaus als Risikogebiet bezeichnen. «Das Vorkommen des FSME-Virus ist möglich», so der Arzt. Die Gefährdung sei jedoch nicht vergleichbar mit der Region Gaster und See, welche als Hochrisikogebiet gelte.

Obwohl das Risiko nicht besorgniserregend sei, sei eine Ansteckungsgefahr vorhanden. «Rund ein Drittel aller FSME-Fälle ereignen sich ausserhalb der bestehenden Hochrisikogebiete», erklärt der Arzt.

BAG empfiehlt eine Impfung gegen FSME

Um einer Hirnhautentzündung (FSME) vorzubeugen, empfiehlt das Bundesamt für Gesundheit (BAG) die dafür geeignete Impfung. «Diese ist für alle Personen empfohlen, speziell für diejenigen, die in Hochrisikogebieten wohnen oder sich zeitweise dort aufhalten», so das BAG.

Für die ebenfalls von Zecken übertragene Lyme-Borreliose gibt es noch keinen Impfstoff. Laut dem BAG sind in der Schweiz rund 5 bis 30 Prozent – stellenweise bis 50 Prozent – der Zecken mit «Borrelia burgdorferi» infiziert. Das Risiko einer Ansteckung mit der Lyme-Borreliose im Glarnerland sei etwa gleich gross wie in der restlichen Schweiz, so Zeckenexperte Norbert Satz auf Anfrage. (nm)

TagesAnzeiger

Die Armee auf der Jagd nach neuen Feinden: Zecken

Spezialisten des Militärs haben diese Woche auf dem Horgenberg eine besondere Mission gestartet: Sie sammeln Zecken. Der Bund will mit den Funden eine Gefahrenkarte erstellen.

Von Res Hinterberger

Horgen/Thalwil. – Im Tarnanzug haben WK-Soldaten aus Spiez am Dienstag den Horgenberg durchstreift. Gegen Zeckenstiche geimpft und die Hosenstösse mit Klebeband verschlossen, hielten sie Stangen in den Händen, an denen weisse Frotteetücher befestigt waren. Damit strichen sie über das hohe Gras und über die Büsche. Die Zecken glaubten jeweils an einen Wirt im Vorbeimarsch – und klammerten sich am weissen Tuch fest.

Die Soldaten lösten die Spinnentiere und sammelten sie in kleinen Glasröhrchen. So verpackt landen die Zecken in einem Labor des ABC-Kompetenzzentrums in Spiez. Ziel der Aktion ist es, eine Risikokarte zu erstellen, welche die Gebiete für die gefährliche Zecken-Hirnhautentzündung aufzeigt. Rahel Gäumann ist Virologin und Leiterin dieses Projektes des Bundesamtes für Bevölkerungsschutz und der Universität Bern. Die Gefahrenkarte soll die vorhandenen Karten des Bundes ergänzen, sagt sie. «Bis jetzt hat man gestochene und erkrankte Personen statistisch erfasst und aufgrund dieser Daten die Kar-

ten erstellt.» Mit dem Projekt werden erstmals die Zecken untersucht: Gäumann will herausfinden, wo sich Zecken befinden, die das gefährliche Virus in sich tragen.

Dafür sammeln WK-Soldaten an rund 200 Orten in der Schweiz jeweils etwa 400 Zecken ein, total also rund 80 000 Tiere. Damit sollte die Stichprobe laut Gäumann gross genug sein, um eine verlässliche Aussage über die Gefährdung der einzelnen Gebiete abzugeben. Gäumann rechnet damit, dass die Arbeiten Anfang Herbst abgeschlossen sind. Sollten die Resultate neue Herde mit gefährlichen Zecken aufzeigen, werden die Messungen in den folgenden Jahren regelmässig wiederholt.

Hosen tragen und nicht ins Gebüsch

Die Zecke ist ein Spinnentier, das verschiedene Krankheitserreger verbreitet. Unter anderem kann sie das Virus auf den Menschen übertragen, das Hirnhautentzündungen verursacht. Allerdings tragen lediglich etwa 0,5 bis 3 Prozent aller Zecken dieses Virus in sich. Experten empfehlen, bei Waldspaziergängen lange Hosen und geschlossene Schuhe zu tragen. Idealerweise sollte man vor allem Berührungen mit Gras und Gebüsch vermeiden. Nach einem Aufenthalt im Wald sollte man zudem den ganzen Körper nach Zecken absuchen. (reh)



Urs Suter, Leiter Forst- und Bauamt Oberurnen, bei der Jungholzpflanze. Im Jungholz, wo sich auch gerne Tiere wie Rehe oder Füchse aufhalten, gibt es viele Zecken.

Bild Bettina Sticher

Zecken machen vor Glarnerland nicht Halt

Obwohl wenig risikoreiches Gebiet, wird Impfung gegen Zeckenenzephalitis empfohlen

Zeckenalarm in nördlichen Gebieten der Schweiz. Der Kanton Glarus gehört zwar nicht zu den Risikogebieten für Zeckenenzephalitis. Trotzdem wird auch in der Region eine Impfung empfohlen.

Von Bettina Sticher

«Das Glarnerland ist noch nicht so stark betroffen. Trotzdem empfehlen wir den Leuten, sich impfen zu lassen», sagt René Ochsenbein, Arzt und Rheumatologe

FMH aus Näfels sowie Präsident der Rheumaliga Glarus.

Auch Glarner sollten sich impfen

Impfen kann man sich nur gegen eine der beiden von den Zecken übertragenen Krankheiten: nämlich gegen die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME, auch Zeckenenzephalitis genannt).

«Das von der Zecke auf den Menschen übertragene Virus kann eine Hirnhaut- oder sogar eine schwere Hirnentzündung verursachen, die im schlimmsten Falle

tödlich endet.» Gemäss Ochsenbein ist dieses Risiko im Glarnerland zwar noch sehr klein. Trotzdem ist er der Meinung, dass auch die Bewohner der Region sich impfen lassen sollten, denn erstens verändere sich die Dichte der infizierten Zecken alljährlich und zweitens hielten sich die Leute durch die Mobilität ja auch oft in risikoreicheren Gebieten auf: «Der moderne Mensch kommt einfach in Kontakt mit Zecken.»

Für Leute, die im Wald arbeiten oder sich aus anderen Gründen öfters im Wald aufhalten, gerade auch für Kinder, hält er daher die Impfung für dringend angeraten. Diese erfolgt in drei Etappen: Zwei Impfungen im Abstand von einem Monat sowie eine Auffrischung ein Jahr später. Die Risiken für Nebenwirkungen sind gemäss Ochsenbein sehr gering. Für Kinder wird die Impfung erst ab sechs Jahren empfohlen, weil es bei jüngeren Kindern praktisch nie zu einem schwereren Verlauf der Krankheit kommt, wie Ochsenbein erklärt.

Sich gegen Zeckenstiche schützen

Die Impfung ersetzt allerdings die Vorsicht nicht. Denn gegen die zweite von Zecken übertragene Krankheit, die Lyme-Borreliose, ausgelöst durch das Bakterium *Borrelia*, kann man sich nicht impfen. Dieser Erreger kommt laut René Ochsenbein auch im Glarnerland gehäuft vor. «Die Verteilung ist inzwischen praktisch ausgeglichen. Mittlerweile gibt es überall Borreliose-Erreger, wo es Zecken gibt.»

Neben einem guten Schutz (Schuhe, Kleidung, Sprays, schnelles Entfernen mit Pinzette) empfiehlt Ochsenbein, sich beim Arzt zu informieren und falls nötig behandeln zu lassen. «Dann dauert die Einnahme der Antibiotika nur etwa eine Woche und man gelangt nicht in ein späteres Stadium der Erkrankung.» Eine der Spätfolgen, die eine unbehandelte Borreliose haben kann, ist zum Beispiel Arthritis.

Für Waldarbeiter empfohlen

Besonders empfohlen wird die Impfung gegen FSME für Menschen, die beruflich regelmässig im Wald zu tun haben. «Meine Leute und ich impfen uns seit 10 bis 20 Jahren. Seit rund fünf Jahren wird vom Kanton aus offiziell empfohlen, sich impfen zu lassen», sagt Urs Suter, Leiter des Bau- und Forstamtes und Förster aus Oberurnen. Zuvor habe es immer geheissen, der Kanton Glarus sei kein Risikogebiet.

Aber auch dies stimme nur noch bedingt, ist Suter überzeugt. «In gewissen Regionen beobachte ich eine Zunahme der Zecken, zum Beispiel im «Bruch» Oberurnen». Zudem müsse nur ein Hund, der eine infizierte Zecke im Risikogebiet aufgelesen habe, hier durch den Wald streifen. «Die Zecke kann sich dann das nächste Opfer suchen. Mir ist das Risiko zu gross», sagt Suter, obwohl er und seine Arbeiter noch nie eine Krankheit aufgelesen haben – auch keine Borreliose.

Auf der Försterschule aber kannte er vor 20 Jahren einen Kameraden, der an der FSME erkrankte. Jeden Abend sucht sich Urs Suter unter der Dusche nach Zecken ab und er entdeckt auch regelmässig welche, wie er erzählt. Der Förster empfiehlt die Impfung auch allen, die sich sonst regelmässig im Wald aufhalten, zum Beispiel «beim Walking, beim Spazieren oder beim Pilzesuchen».

Keine infizierten Zecken gefunden

Aller Zeckenängste zum Trotz: Vom Kantonsoberförster Fritz



Urs Suter hat in den paar Minuten, in denen er für das Zeitungsbild im Jungholz posierte, bereits einen ungebeten Gast auf der Hose erwischt.

Bild Bettina Sticher

Marti erhielt Urs Suter dieser Tage erfreuliche Post: von 961 untersuchten Zecken im Kanton (davon 298 Chelenwald, Mollis, und 492 Bitzi, Ennenda, acht Chatzenritt, Luchsingen, und Ober Ennetlinth, Linthal, ist keine einzige Zecke infiziert. Doch auch dies ist keine wirkliche Entwarnung. In der Nachbarschaft des Kantons wurden im Raum Zürichsee und im Kanton Uri verschiedene infizierte Zecken gefunden.

Schweizweit hatten letztes Jahr Angehörige der Armee und Mitarbeiter des Labor Spiez unter Leitung von Rahel Gäumann während 930 Arbeitsstunden 62 343 Zecken gesammelt und untersucht.

Der
Landbote

Auf der Jagd nach 400 Zecken

Ein Biologenteam sammelt an 200 Orten in der Schweiz – so auch in Dorf – je 400 Zecken. Aus den Laboranalysen wird eine Karte entstehen. Ziel ist die Reduktion von Krankheiten.

DORF – Von Weitem hört man die Kirchenglocken läuten. Es ist Mittag. Der Himmel ist bewölkt. Das Wetter ist, wie seit Tagen schon, durchgezogen. «Kein optimalen Bedingungen, um Zecken zu finden», sagt Rahel Gäumann. Zecken bevorzugen Trockenheit, Windstille und eine Temperatur zwischen 14 und 21 Grad. Jetzt ist der Boden feucht. Die 25-jährige Studienkoordinatorin und ihre sechs Teamkollegen entsteigen trotzdem ihrem blauen Kastenwagen am Waldrand in Dorf (Flaachtal) und bereiten ihre Ausrüstung vor. Diese mutet spartanisch an. Zum einen ein Stock, an welchem ein weisses Frottétuch befestigt ist. Zum anderen ein Reagenzglas und eine Pinzette.

Kurz darauf schwärmen die sieben Angestellten des Labors Spiez aus. Rahel Gäumann bleibt am Strassenrand, der an den Wald grenzt. Sie zieht das weisse Frottétuch über die Böschung. Nach nicht einmal zehn Metern hält sie bereits an und dreht ihr Sammelnetz um. Volltreffer! Gleich zwei Zecken sitzen darauf. Ein ausgewachsenes Männchen und eine Nymphe. Für uns Menschen seien vor allem die Jungtiere gefährlich, also die Larven und Nymphen, erklärt Gäumann. Diese könne man im Gegensatz zum ausgewachsenen Tier kaum auf Haut oder Kleidung erkennen. Sie seien aber gleich gefährlich wie ihre älteren Artgenossen. In jeder Wachstumsphase braucht die Zecke einmal Blut. Da-



Mit Frottétuch am Waldrand suchen Rahel Gäumann (Zweite von links) und ihr Team. Rechts: Die gefundene Zecken kommen in ein Reagenzglas. Bild: Tony Dier

bei sind die Zeckenstiche an sich nicht schlimm. Die eigentliche Gefahr geht von Erregern aus, welche eine infizierte Zecke in ihrem Darm mit sich herumträgt. Am bekanntesten ist hier wohl die Borreliose. Gäumann schätzt, dass bis zu 50 Prozent aller Zecken mit dem Borreliosevirus verseucht sein könnten. Weniger bekannt, aber nicht weniger gefährlich ist die Früh-sommer-Meningoenzephalitis (FSME, siehe Kasten). «In der Schweiz tragen zwischen 0,5 und 3 Prozent aller Zecken den FSME-Erreger in sich», erklärt Gäumann, während sie die Zecken in ihr Reagenzglas steckt. Wie gross der Anteil der FSME-Träger genau ist, will sie im Auftrag des Labors Spiez herausfinden.

Die schweizerische FSME-Karte basiert im Moment auf den Fällen, bei denen Menschen durch Zecken infiziert wurden. Glaubt man dieser Karte, gibt es die FSME-Erreger beispielsweise in Graubünden oder im Wallis nicht. Es könne aber sein, dass sich dort einfach niemand angesteckt habe, gibt Gäumann zu bedenken.

Von Zecken träumen

Die Hosenaufschläge in die Socken gesteckt, wagt sich Rahel Gäumann nun ins Dickicht. Man müsse den Standort für die Suche häufig ändern. Eine ausgewachsene Zecke bewege sich höchstens in einem Radius von einem Meter, erklärt Gäumann. «Irgendwann ist eine Stelle abgegrast.»

Das weisse Frottétuch hat sich durch das wiederholte Ziehen durch das Unterholz leicht bräunlich verfärbt. Neben Käfern und anderem Kleingetier krabbeln immer wieder Zecken

darauf herum. Mit geschultem Auge findet Gäumann die kleinen Spinnentiere blitzschnell. 400 Exemplare will die siebenköpfige Gruppe in Dorf sammeln. Dabei ist dies nur eine von 200 Stationen in der ganzen Schweiz.

Am Ende soll auf einer Basis von 80000 Zecken eine FSME-Karte entstehen. Rahel Gäumann, die sich mit dieser dreijährigen Arbeit den Dokortitel an der Universität Bern erarbeiten will, gibt zu, dass es auf Dauer nicht wirklich spannend ist, Zecken zu suchen: «Es gibt Tage, an denen man innert zehn Minuten nur zwei Zecken findet. Mittlerweile träume ich in der Nacht bereits davon, wie ich die Zecken mit der Pinzette von weissen Tüchern entferne.» Entsprechend froh ist sie, dass nach etwas mehr als einer Stunde bereits mehr als 400 Exemplare in den Reagenzgläsern krabbeln. Sie selber hat 150 davon beigesteuert. Durch Glück hatte sie einen Platz gefunden, an dem es geradezu von Zecken wimmelte.

Dank einem Grashalm im Reagenzglas haben die Zecken genügend Feuchtigkeit, um bis zur Ankunft im Labor zu überleben. Dort werden sie dann schockgefroren, sortiert und analysiert. Zuvor kommen die gesammelten Dorfemer Zecken zu jenen, die das Team am Morgen in Illnau gesammelt hat. «Das Wichtigste am ganzen Projekt ist, dass wir Krankheiten verhindern können», sagt Rahel Gäumann und steigt wieder in den blauen Kastenwagen. Feierabend ist noch lange nicht. Die Stationen am Nachmittag sind Marthalen und Oberstammheim.

MICHAEL WEBER

Examples of newspaper articles on study results

15.04.2010	Berner Zeitung	„Von Zeckenstichen droht Gefahr“
12.05.2010	Berner Oberländer	„FSME-positive Zecken eruiert“
12.05.2010	Bote der Urschweiz	„Zeckengefahr in Gersau“
12.05.2010	Der Bund	„Aufwendige Zeckenstudie mit beschränkter Aussagekraft“
12.05.2010	Luzerner Zeitung	„Zeckengebiet grösser als gedacht“
12.05.2010	Obwalden und Nidwalden Zeitung	„Wenn es unter die Haut geht“
12.05.2010	Berner Zeitung	„Wo gefährliche Zecken lauern“
12.05.2010	Tages-Anzeiger Zürich	„Infizierte Zecken weit verbreitet“
12.05.2010	Neue Zürcher Zeitung	„FSME-Virus-infizierte Zecken auch im Wallis“
12.05.2010	Corriere del Ticino	„Zecche, nuove focolai d'infezione »
12.05.2010	Walliser Bote	„Die gefährlichsten Zecken“
12.05.2010	Zürichsee Zeitung, Issue „Meilen“	„Infizierte Zecken gibt's fast überall“
14.05.2010	Sarganserländer	„Melser und Stadtnet Zecken tragen den FSME-Virus nicht“
14.05.2010	Obwalden und Nidwalden Zeitung	„Unter die Haut gegangen“
15.05.2010	Die Südostschweiz, Issue „Graubünden“	„Auch im Graubünden stechen wieder infizierte Zecken“
19.05.2010	Bieler Tagblatt	„Eine gute Nachricht ist auch eine Nachricht“
19.05.2010	Engadiner Post	„Im Wald auf Shorts und Sandalen verzichten“
20.05.2010	Rontaler	„Auch das Rontal hat seine Zecken“
28.05.2010	Basellandschaftliche Zeitung	„Zecken im Fricktal: Blutsauger sind aktiv“
28.05.2010	Beobachter	„Neue Gefahr fürs Hirn“
04.06.2010	Die Südostschweiz, Issue „Gaster und See“	„Blutsauger auf dem Vormarsch“

BERNER ZEITUNG **BZ**

LABOR SPIEZ

Von Zeckenstichen droht Gefahr



Die dreiteilige Impfung gegen das FSME-Virus kann vom Hausarzt verabreicht werden.



Eine Zecke auf dem Daumen.

PETER ROTHACHER

Die von Zecken übertragene Krankheiten werden heute ernst genommen. Die Zählaktion des Labors Spiez vom letzten Jahr beweist das. Obschon die Resultate noch ausstehen, wird mit einer Zunahme der Zecken gerechnet.

Vor knapp einem Jahr hat das Labor Spiez mit der Mikrobiologin Rahel Gäumann und 20 Angehörigen der Armee zur Zeckenjagd geblasen. An gegen 160 Stellen der Schweiz wurden rund 62 000 dieser Winzlinge eingesammelt.

«Bei dieser Aktion steht nicht die Zahl der dort vorkommenden Zecken im Vordergrund, sondern der Prozentsatz der gefährlichen Virusträger», sagte Rahel Gäumann damals. Es gehe somit um die Frage, wie viele von ihnen die Frühsommer-Me-

ningoenzephalitis (FSME), welche beim Menschen zur gefürchteten Hirnhautentzündung führen kann, übertragen.

Vorsicht in diesen Regionen

Gäumann erarbeitete mit den Untersuchungen am Institut für Infektionskrankheiten ihre Dissertation. Diese Doktorarbeit und damit zusammenhängende Urheberrechte seien mit ein Grund, dass die Resultate der letztjährigen Erhebungen noch nicht publik gemacht worden seien, erklärt sie.

Ursprünglich sollten erste Erkenntnisse der Studie im vergangenen Herbst veröffentlicht werden. Somit ist über die zahlenmässige Verbreitung der Virusträger noch nichts Genaues bekannt. Klar ist aber seit Jahren, dass die Regionen von Belp über Steffisburg, Thun und Spiez bis hinauf nach Frutigen und ins untere Simmental als FSME-Gefahrenherde gel-

ten. «Man geht davon aus, dass 0,5 bis 3 Prozent der Zecken diesen Erreger in sich tragen», sagte Gäumann vor einem Jahr. In der Schweiz werden jährlich 100 bis 150 FSME-Erkrankungen gemeldet, im Spitzenjahr 2006 waren es gar 256 Fälle. Eine Ansteckung verläuft in den meisten Fällen ohne Symptome. Bei 15 Prozent der Infizierten wird aber das zentrale Nervensystem befallen, rund 1 Prozent der Betroffenen stirbt an den Folgen. Personen, welche der Gefahr eines Zeckenstichs übermässig ausgesetzt sind, können sich mittels Impfung schützen. Diese wird vom Hausarzt in drei zeitlich abgestuften Teilen per Spritze in den Oberarm verabreicht.

Gefahr droht vielerorts

Zecken verbreiten aber viel häufiger ein Bakterium, welches beim Menschen die Lyme-Borreliose, eine zweite schwere Er-

krankung, hervorrufen kann. Schweizweit sind jährlich zwischen 3000 und 5000 Leute neu davon betroffen. Gegen diese Krankheit, welche Zecken praktisch in der ganzen Schweiz übertragen können, besteht kein Impfschutz. Vorausgesetzt, die Krankheit wird früh erkannt, kann sie mittels Antibiotika geheilt werden. Ansonsten kann sie zu schweren körperlichen Be-

hinderungen oder sogar Invalidität führen.

Mehr oder weniger Zecken?

Früher glaubte man, dass strenge Winter den Zecken zusetzen. Heute überwiegt die Meinung, dass eine geschlossene und gut isolierende Schneedecke, wie sie im vergangenen Winter vorherrschte, das Überleben der Zecken im Waldboden eher be-

günstigt. Kantonsarzt Thomas Schochat glaubt, «dass klimatische Bedingungen sicher einen Einfluss auf die Zeckenpopulation haben». Er empfiehlt Personen ab 6-jährig, die sich häufig in Risikogebieten aufhalten, die Impfung gegen den FSME-Erreger. Laut Schochat ist die Impffreudigkeit bisher nicht sehr gross.

BERNER OBERLÄNDER

VON BEMP ÜBER THUN/SPIEZ BIS REICHENBACH UND ERLÉNACH

FSME-positive Zecken eruiert

PETER ROTHACHER

Das Risiko, über eine Zecke vom FSME-Erreger befallen zu werden, ist gering. Aber in unserer Region besteht die Gefahr.

In den Regionen Bemp, Thun, Spiez, Reichenbach und Erlénbach gibt es Zecken, die den für Menschen gefährlichen Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)-Erreger in sich tragen. Diese Tatsache war aufgrund gemeldeter Krankheitsfälle bereits bekannt. Die im April 2009 erfolgte Zählaktion des Labors Spiez mit Armeeangehörigen (wir haben berich-



tet) und die anschliessende Analyse von rund 62 000 Zecken durch die Mikrobiologin Rahel Gäumann (Bild) liefern nun eine wissenschaftliche Bestätigung.

Hoher Wert in Erlénbach

Die Studie gibt darüber Auskunft, wo wie viele Zecken mit dem FSME-Virus befallen sind. In Erlénbach waren das bei der Zählung im April 2009 vier von 449 Zecken (siehe Kasten). Das sind 0,89 Prozent – die höchste Quote im Kanton Bern. Schweizweit wird

sie nur vom aargauischen Brittnau (1,09%) und dem zürcherischen Oberstammheim (1,11%) übertroffen. In Reichenbach betrug die Quote 0,52, im Spiezer Rustwald 0,43, im Thuner Scho-

renwald 0,30 und in der Region Bemp 0,21 Prozent. Auch Unterseen war eine der 20 untersuchten Regionen im Kanton Bern. Hier wurden – wie an den übrigen 14 Orten – keine FSME-Erreger eruiert.

Mit Vorsicht zu geniessen

«Die 137 negativen Ergebnisse bei insgesamt 175 Zählorten in der Schweiz sind allerdings mit Vorsicht zu geniessen», sagt die Mikrobiologin aus Unterlangenegg. «Die untersuchten Standorte waren geografisch sehr eingeschränkt: einige hundert Meter weiter wäre das Resultat vielleicht anders ausgefallen.»

Es handle sich um eine Momentaufnahme zur Gefahreinschätzung, betont Gäumann. «So haben wir Erreger an Orten gefunden, wo keine Krankheitsfälle aktenkundig sind und umgekehrt.» Dass Zürich mit wenig bekannten Gefahrenherden eine hohe Erkrankungsrate aufweise,

habe auch mit dem Verhalten der Menschen – etwa häufigem Aufenthalt im Wald – zu tun.

Borrelien nicht eruiert

Viel häufiger verbreiten Zecken mit ihrem Stick Borreliose-Erreger, die den Menschen ebenfalls schädigen können. 5 bis 50 Prozent der Zecken sind davon befallen. «Da dieses Bakterium praktisch überall vorkommt, haben wir es nicht eruiert», sagt Rahel Gäumann. Sie meint zum unterschiedlichen Verbreitungsgebiet: «FSME-Viren überleben in Zecken recht eingeschränkt, Borrelien dagegen in Nagetieren – mit ihrem weiten Bewegungsfeld – viel länger. Und die Maus ist ein beliebter Wirt der winzigen Blutsauger.»

Gegen den FSME-Erreger können sich gefährdete Personen impfen lassen. Gegenüber der Borreliose besteht keine solche Schutzmöglichkeit.

Mehr oder weniger Zecken?

In diesem Jahr wird laut dem Arzt und Zeckenspezialist Norbert Satz (Zürich) in unseren Wäldern mit einer hohen Zeckenpopulationen zu rechnen sein. Er führt dies auf den kalten Winter zurück, den die Zecken in der Winterstarre überlebt haben. «Andererseits war der April sehr trocken, und das schadet den erwachenden Zecken», relativiert Rahel Gäumann diese Prognose.



Zeckenzählung: Ein Armeeangehöriger streicht mit einem weissen Tuch, an dem die Zecken hängen bleiben, durchs Unterholz. Archiv BO/Hubacher

UNTERSUCHTE ZECKEN			
An fünf Orten FSME-Erreger eruiert			
Gemeinde	Untersuchte Zecken	FSME-positive Zecken	in Prozent
Erlenbach	449	4	0.89
Spiez Rustwald	462	2	0.43
Spiez Einigenwald	534	0	0
Reichenbach	384	2	0.52
Thun	332	1	0.30
Belp	467	1	0.21
Unterseen	445	0	0

Zeckengefahr in Gersau

Bisher galt der Kanton Schwyz als nicht von Zeckenhirnhautentzündungen betroffenes Gebiet. Jetzt sind in Gersau und Freienbach aber Infektionen nachgewiesen worden.

Kanton. – Die bisherigen Erhebungen im Zusammenhang mit gefährlichen Zeckenbissen haben sich auf die jeweiligen Krankheitsfälle gestützt. Aufgrund dieser gemeldeten Daten wurde dann jeweils eine Risikoabschätzung vorgenommen. Bisher wies diese für den Kanton Schwyz keine kritischen Zonen auf, in denen Zecken das Hirnhautentzündungsvirus übertragen können.

Zecken selber untersucht

Nun hat das Virologie-Labor Spiez des Bundes eine breite Untersuchung zu dieser viralen Erkrankung durchgeführt. Dabei wurde die tatsächliche Infektionsrate bei den Zecken selber untersucht. Das Ergebnis hat auch für den Kanton Schwyz zwei kritische Gebiete nachgewiesen, aus denen bisher nur isolierte FSME-Krankheitsfälle gemeldet worden waren. Das eine Gebiet betrifft gemäss Angaben des Virologie-Labors den Bezirk Gers-

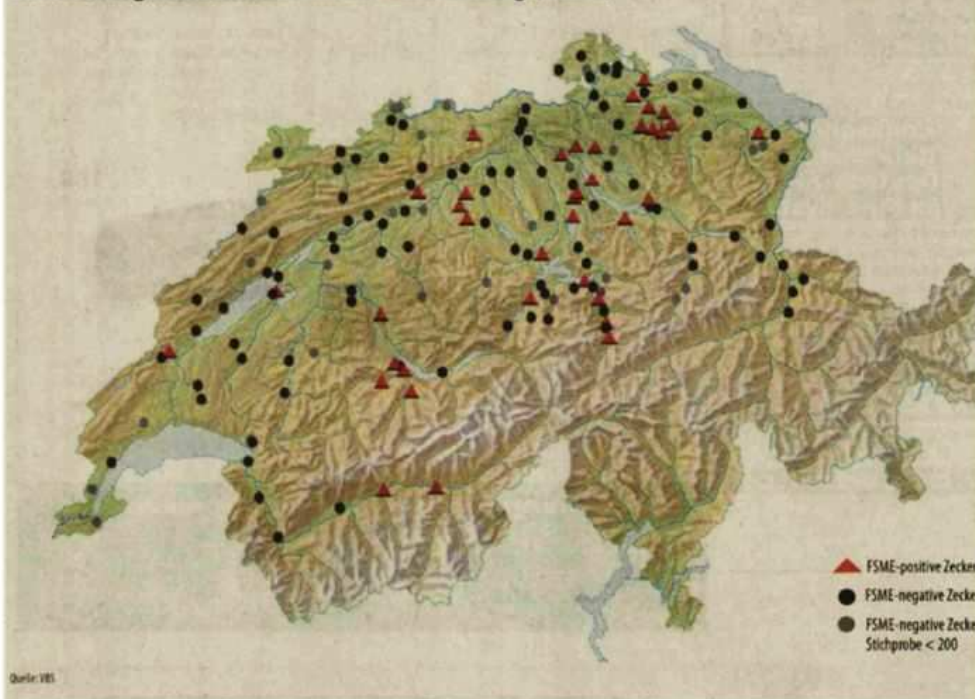
au, das andere die Gemeinde Freienbach. In Gersau sind 546 und in Freienbach 434 Zecken untersucht worden. Das Bundesamt für Gesundheit empfiehlt allen Personen in sogenannten Endemiegebieten, sich gegen die Krankheit zu impfen. Ebenfalls Untersuchungen an Zecken durchgeführt worden sind in den Gemeinden Arth, Schwyz und Riemenstalden. Dabei wurden keine Infektionen nachgewiesen.

Welches sind die Symptome?

Die Zeckenhirnhautentzündung ist eine virale Erkrankung des zentralen Nervensystems. Bei etwa 70 Prozent der infizierten Personen verläuft die Ansteckung ohne Symptome und bleibt damit unentdeckt. In den anderen Fällen treten ein bis zwei Wochen nach dem Zeckenbiss grippeähnliche Symptome von Fieber über Müdigkeit bis zu Kopf- und Gelenkschmerzen auf. Diese enden in den meisten Fällen mit einer definitiven Heilung. In etwa 15 Prozent der Fälle aber entwickelt sich eine zweite Krankheitsphase, in welcher die Viren das zentrale Nervensystem befallen und Hirnhaut-, eine Hirn- und/oder Rückenmarkentzündung auslösen können. Begleitet ist diese Entzündung von starken Kopfschmerzen, Übelkeit, Schwindel, Sprech-, Schluck- und Gehstörungen. Im Extremfall sind Lähmungen der Arme, Beine und Gesichtsnerven oder der Tod möglich. (cj)

Der Bund

Verbreitung der Zeckenhirnhaut-Entzündung (FSME)



Aufwendige Zeckenstudie mit beschränkter Aussagekraft

Soldaten haben in 20 Berner Gemeinden nach gefährlichen Zecken gesucht.

Reto Wissmann

Kaum wird es Frühling, wächst die Angst vor den Spinnentierchen. Ganz unbegründet ist sie nicht. Stellenweise kann jede zweite Zecke Borreliose übertragen. Rechtzeitig entdeckt kann diese Infektion jedoch gut behandelt werden. Deutlich seltener, aber auch deutlich gefährlicher sind Zecken, die das FSME-Virus in sich tragen und Frühsommer-

Meningoenzephalitis übertragen können. Diese Form der Hirnhautentzündung greift das zentrale Nervensystem an und kann bis zum Tod führen. Das Bundesamt für Gesundheit empfiehlt deshalb allen Personen, die sich in Gebieten mit FSME-infizierten Zecken bewegen, sich impfen zu lassen. Doch wie weiss man, welche Gebiete betroffen sind?

Bisher existierten in der Schweiz nur

Karten, auf denen die registrierten Krankheitsfälle eingezeichnet waren. Wo sich die Leute angesteckt haben, war nicht ersichtlich. Nun hat sich eine Doktorandin am Institut für Infektionskrank-

heiten der Uni Bern zusammen mit dem Labor Spiez des Bundesamts für Bevölkerungsschutz auf die Suche nach den infizierten Zecken gemacht. Im Frühling

letzten Jahres schwärmten 60 Soldaten mit weissen Frotteetüchern aus und sammelten während 900 Stunden in 200 Schweizer Gemeinden Zehntausende von Zecken ein. Anhand der Untersuchungsergebnisse wurde eine Risikokarte erstellt und gestern publiziert (siehe oben). «Wir haben an Orten Erreger gefunden, die bisher als FSME-frei galten», sagt Studienleiterin Rahel Gäumann. So habe man vermutet, dass es in den Alpen kaum FSME-Viren gebe. Nun seien aber auch im Wallis infizierte Zecken gefunden worden. Andererseits sei man davon ausgegangen, dass die Viren im Berner Seeland und im Berner Jura verbreitet seien. Die Studie habe dies nun aber nicht bestätigt.

Weniger gefährliche Zecken

Laut der neuen Untersuchung liegt die Zahl der gefährlichen Zecken tiefer als erwartet. Bisher ist man in der Schweiz

von 0,5 bis 3 Prozent FSME-infizierten Zecken ausgegangen. Die Studie hat jetzt einen Wert von 0,46 Prozent ergeben. Auch in Endemiegebieten ist das Risiko, angesteckt zu werden, also relativ gering. In Belp beispielsweise wurden 467 Zecken eingesammelt und nur eine trug das Virus. Belp gilt nun dennoch als Risikogebiet. Insgesamt kommt Gäumann zum Schluss: «Es gibt weniger FSME-infizierte Zecken als erwartet, sie sind aber geografisch weiter verbreitet.» Das Tessin ist übrigens aus Zeitgründen nicht einbezogen worden.

Die aufwendige Studie liefert zwar punktuell verlässlichere Daten als frühere Erhebungen. Ihre Aussagekraft ist aber sehr beschränkt, wie Gäumann selber eingestehen muss. Gerade das Beispiel Spiez zeigt, dass es in einem Waldstück FSME-infizierte Zecken geben kann, in einem anderen Gebiet hingegen nicht. Dort wurden im Rust- und im nur

einen Kilometer entfernten Einigenwald insgesamt rund 1000 der kleinen Blutsauger eingesammelt. Im Rustwald wurde der FSME-Erreger bei zwei Zecken nachgewiesen, im Einigenwald bei keiner einzigen.

5 Gemeinden mit FSME

In folgenden 5 Berner Gemeinden wurden Zecken mit FSME-Viren gefunden: **Belp, Thun, Reichenbach i. K., Erlenbach i. S., Spiez (Rustwald).**

In 15 Gemeinden trugen die eingesammelten Zecken keine FSME-Viren: **Bern, Köniz, Aarberg, Aarwangen, Wynigen, Busswil, St-Imier, Gampelen, Fraubrunnen, Unterseen, Moutier, Orpund, Spiez (Einigenwald), Wangen a. A., Signau.** (rw)

Zentralschweiz

Zeckengebiet grösser als gedacht

In Ebikon, Gersau und Freienbach finden Forscher infizierte Zecken. Bislang galten diese Gebiete als ungefährlich.

VON SIMON SCHÄRER

Das gefährliche Zecken-Hirnhautentzündungs-Virus (FSME) ist in der Zentralschweiz weiter verbreitet als bislang angenommen. Dies zeigt eine neue Studie des VBS-Labors in Spiez – schweizweit wurden 60 000 Zecken an über 160 Standorten untersucht. Bislang galten im Kanton Luzern die Region Sursee-Wiggertal, in Ob- und Nidwalden Stans, Buochs, Bürgenstock, Stanserhorn und Kerns, in Uri das Untere Reusstal sowie Seelisberg und im Kanton Zug Steinhäusen als Zeckengebiete. Die bisherige Risikokarte des Bundesamtes für Gesundheit (BAG) basierte auf den gemeldeten Krankheitsfällen.

Ebikon galt als zeckenvirenfrei

Jetzt kommen in der gestern präsentierten Verbreitungskarte – sie basiert auf infizierten Zecken, die die Forscher gefunden haben – auch Ebikon, Gersau und Freienbach hinzu. «In diesen Gemeinden kamen bisher keine oder nur sehr vereinzelte Krankheitsfälle vor, sie galten als zeckenvirenfrei», sagt Rahel Gäumann vom Labor Spiez. Die Studie sei aber nur eine Momentaufnahme.

Trotzdem: «In diesen Gebieten besteht eine grössere Gefahr, sich mit FSME anzustecken», sagt Gäumann. Bedeutet dies nun, dass im Fall von Ebikon auch in der ganzen Agglomeration Luzern mit gefährlichen Zeckenbissen gerechnet werden muss? «Wir können nur für Ebikon konkrete Zahlen vorlegen», sagt Gäumann. «Aber generell sehen wir, dass infizierte Zecken verbreiteter sind als bisher angenommen.»

Diese Aussage deckt sich auch mit

Beobachtungen in der übrigen Schweiz. In der Studie wurden in mehreren Gebieten – die bisher nicht als Risikogebiete galten – infizierte Zecken gefunden. Beispielsweise in Raron und Salgesch VS.

Nervensystem, die durch Zeckenstiche übertragen wird. Bei etwa 70 Prozent der Infizierten verläuft die Ansteckung ohne Symptome. In den anderen Fällen entwickeln sich ein bis zwei Wochen nach dem Zeckenstich grippeähnliche Symptome wie Fieber, Müdigkeit, Kopf- und Gelenkschmerzen. Bei etwa 15 Prozent der infizierten Personen entwickelt sich eine zweite Krankheitsphase, in welcher die Viren das zentrale Nervensystem befallen. Folgen sind starke Kopfschmerzen, Übelkeit, Schwindel, Konzentrations-, Schluck-, Sprech- und Gehstörungen. Bei sehr schweren Verlaufsformen treten Lähmungen der Arme, Beine oder Gesichtsnerven auf. Etwa 1 Prozent der Betroffenen stirbt.



Impfung empfohlen

Da es keine spezifische Therapie gibt, empfiehlt das BAG allen, die in Risikogebieten wohnen, eine Impfung. In diesem Zusammenhang betont auch Gäumann: «Die neue Verbreitungskarte ist nur eine Ergänzung zur bisherigen Risikokarte des BAG.»

ZENTRALSCHWEIZ

Infizierte Zecken in acht Gemeinden

In der Zentralschweiz wurden 21 Standorte untersucht. Hier wurden infizierte Zecken gefunden:

- **Ebikon** (0,23 Prozent der untersuchten Zecken waren mit dem Virus infiziert, das Zecken-Hirnhautentzündung verursacht.)
- **Dagmersellen** (0,55 Prozent)
- **Gersau** (0,18 Prozent)
- **Freienbach** (0,46 Prozent)
- **Schattdorf** (0,49 Prozent)
- **Sisikon** (0,47 Prozent)
- **Silenen** (0,28 Prozent)
- **Steinhäusen** (0,84 Prozent)

Die tiefen Werte dürften nicht darüber hinwegtäuschen, dass an diesen Orten eine höhere Gefahr besteht, sagt Rahel Gäumann vom Labor Spiez. «Tiefe Werte sind normal, denn nur 0,5 Prozent aller Zecken sind infiziert.» *ssr*



Die Studie und Infos zum Zeckenschutz finden Sie unter www.zisch.ch/bonus

Wenn es unter die Haut geht Gefährliche Zecken im Vormarsch

Erstmals hat das Virologie Labor Spiez untersucht, wo Erreger der gefährlichen Zeckenhirnhaut-Entzündung vorkommen. Anders als auf der existierenden Risikokarte, die sich auf gemeldete Krankheitsfälle von Menschen abstützt, taucht in der Studie auch Alpnach als gefährdetes Gebiet auf.



Im Gebiet des Hinterbergwaldes bei Alpnach wurde eine Zecke mit Erregern von Hirnhautentzündung gefunden.

Foto: Francesco Welti

Das Bundesamt für Gesundheit (BAG) veröffentlicht jährlich eine Karte mit Gebieten aus denen Fälle von Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME), wie die Krankheit genau heisst, bekannt sind. In Nidwalden sind das Stans, Buochs und der Bürgenstock, in Obwalden Kerns sowie Teile des Stanserhorns auf beiden Kantonsseiten. Aufgrund der Studie des Labors in Spiez muss das Bild über die Befallsgebiete in der Schweiz nun revidiert werden, denn in bisher von den gefährlichen Zecken-Viren als unberührt geführten Regionen wie dem Wallis sind Infektionen nachgewiesen worden. Auch im Hinterbergwald in Alpnach ist ein solcher Fund erfolgt, wie Rahel Gäumann vom Virologie Labor Spiez gegenüber der ONZ bestätigt: Von 384 gefangenen Zecken trug eine das gefährliche Virus in sich.

Bekannte Befallsgebiete

Gesammelt haben die Forscher im Auftrag des Eidgenössischen Departements für Verteidigung, Bevölkerungsschutz und Sport (VBS) auch in Beckenried, Engelberg, Giswil, Kerns, Stans, Stansstad und Wolfenschiessen. Obwohl bekannte Befallsgebiete darunter waren, fanden die Virologen keine weiteren infizierten Zecken: «Wir sind nur punktuell auf die Suche gegangen», erklärt das Gäumann, «Herde kommen aber auf räumlich sehr beschränkten Standorten vor, deshalb könnten ganz in der Nähe trotzdem Zecken mit FSME leben.» Vorsicht vor Zecken

ist in den Wäldern also auf jeden Fall geboten: Die Gefahrenkarte ist nur eine Momentaufnahme ohne Anspruch auf Vollständigkeit.



Ixodus ricinus, die Zecke, die für den Menschen gefährlich sein kann.

Foto: Eingesandt

62'343 Zecken gefangen

Der Aufwand für die Studie war enorm. «Allein schon die Zecken zu sammeln, hat mehr als 900 Stunden gedauert.» 62'343 der Tierchen, die sich so gerne an der Haut festsaugen, sind den Forschern in die Hände geraten, annähernd 3000 in den Ortschaften Nidwaldens und Obwaldens. Wo FSME-Epidemien vorkommen, empfiehlt das BAG allen Personen, sich zu impfen. Die Zeckenhirnhautentzündung (FSME) ist eine virale Erkrankung des zentralen Nervensystems. Wer davon befallen ist, merkt es meist nicht: Bei 70 Prozent der Ansteckungen bleiben Symptome aus. In den übrigen Fällen kommt es ein bis zwei Wochen nach dem Zeckenstich zu grippeähnlichen Symptomen, die wieder verschwinden. Bei bis zu 15 Prozent der infizierten Personen greifen die Viren das zentrale Nervensystem an, was beispielsweise zu Hirnhautentzündung führen kann.

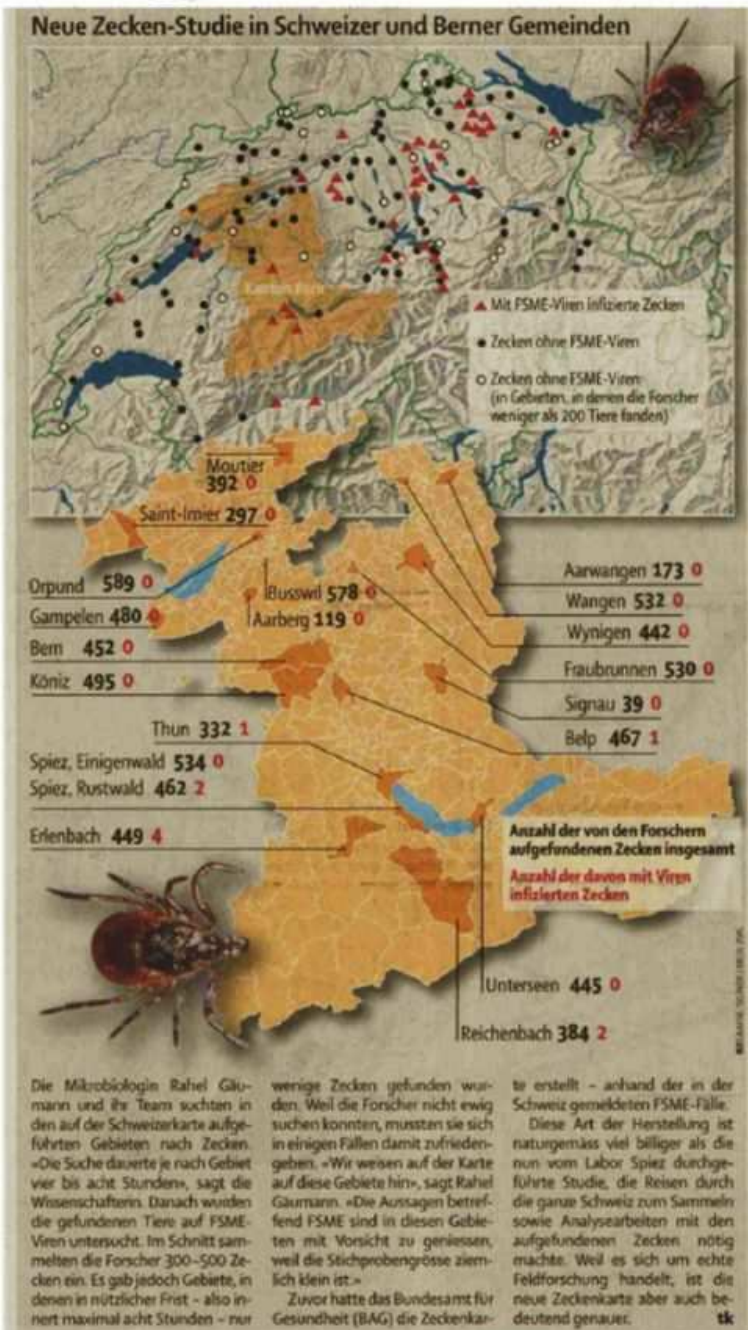
Erkrankungen nehmen zu

Obwohl die Studie neue Erkenntnisse erbracht hat, wird es vorläufig eine einmalige Aktion bleiben, weil der Aufwand dafür zu gross war. «Es hat sich aber gezeigt, dass die Gefahrenkarte nicht vollständig ist, daher sind unsere Erkenntnisse mit der Karte des BAG zu kombinieren», sagt Rahel Gäumann. Die Frühsommer-Meningoenzephalitis ist in Europa auf dem Vormarsch. Die Häufigkeit der Erkrankungen in der Schweiz hat von rund 100 Fällen pro Jahr vor einem Jahrzehnt deutlich auf 200 bis 250 (2005/06) zugenommen.

BERNER ZEITUNG **BZ**

NEUE KARTE MIT DEN VERBREITUNGSGEBIETEN

Wo gefährliche Zecken lauern



Das Labor Spiez gab eine Studie mit Verbreitungskarte zur Zecken-Hirnhautentzündung FSME heraus. Neu basiert die Karte auf Zecken und deren Infektionsrate. Zuvor wurde sie anhand von FSME-Patienten erstellt.

Mithilfe der Studie, die als Grundlage der Karte diente, konnten die Forscher in Spiez mehrere Infektionsherde ausmachen, die bis anhin als FSME-frei gegolten hatten. Sie wiesen auch Infektionsherde in Gebieten nach, aus denen zuvor nur isolierte Fälle der meldepflichtigen Krankheit FSME bekannt gewesen waren.

Federführend für das Forschungsprojekt war Rahel Gümman, Mikrobiologin am Institut für Infektionskrankheiten der Universität Bern. Sie und ihr Team suchten Zeckengebiete vor 175 Gemeinden in allen Kantonen ab. Danach untersuchten sie die Tiere auf FSME-Viren.

Durch die aufwendige Arbeit entstand ein deutlich genaueres Bild, als es die bisherige Zeckenkarte gezeigt hatte. Bisher waren die Hinweise auf die Verbreitung infizierter Zecken aus den Angaben von Patienten geflossen, die an FSME erkrankt waren. Rahel Gümman: «Man konnte die Krankengeschichten dieser Patienten. Sie wurden auch über ihre Ausflüge befragt.»

Mit den neuen Daten konnten

die Wissenschaftler in Spiez infizierte Zecken in den Walliser Gemeinden Raron und Salgesch nachweisen. Zuvor hatte der Kanton Wallis als frei von Zeckenviren gegolten. Mit FSME verseuchte Zecken entdeckten die Forscher auch in den Gemeinden Freienbach SZ, Gersau SZ oder Oensingen SO. Aus diesen Gemeinden waren bislang lediglich isolierte Krankheitsfäl-

le gemeldet worden.

Nur Momentaufnahme

Das Verteidigungsdepartement VBS, zu dem das Labor Spiez gehört, weist jedoch darauf hin, dass auch die neue Karte zur Verbreitung der FSME-verseuchten Zecken nur eine Momentaufnahme ist. Will sagen: Eine Verallgemeinerung auf ganze Regionen ist anhand der Karte nicht möglich. Auch eine Gültig-

keit über grössere Zeiträume ist keineswegs gewährleistet. So kann zum Beispiel ein strenger Winter mit Temperaturen von mindestens minus 20 Grad Celsius die kleinen Spinnentiere lokal ausrotten. **THOMAS KOHLER**

Jetzt online:
Zecken-Gefahrenkarte
Die neue Studie zum Download
www.zecken.bernerzeitung.ch

TagesAnzeiger

Zeckenkarte Infizierte Zecken weit verbreitet

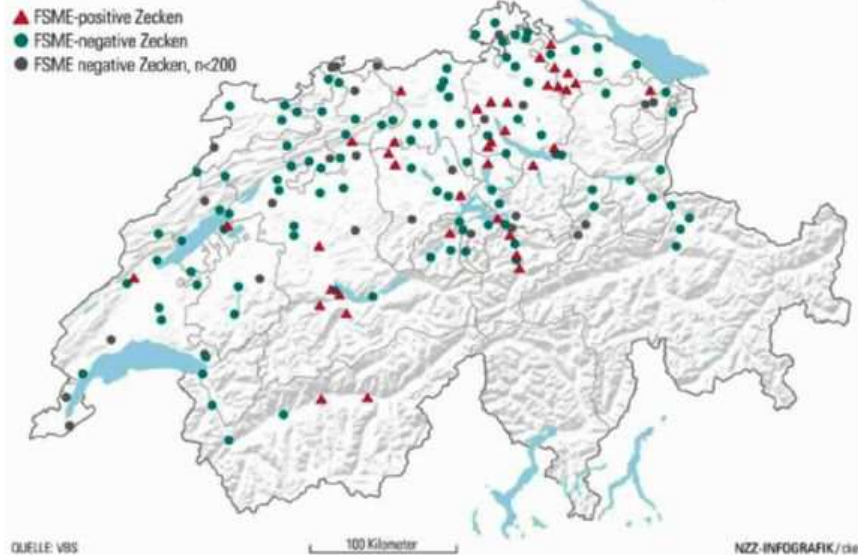
Das Virus, das Zecken-Hirnhautentzündung verursacht, ist in der Schweiz verbreiteter als bisher angenommen. Wissenschaftler haben auch in Gebieten infizierte Zecken gefunden, die bisher nicht als Risikogebiete galten. Die alte Risikokarte stützte sich auf gemeldete Krankheitsfälle. Die neue basiert auf der Infektionsrate von Zecken, wie das Verteidigungsdepartement (VBS) am Dienstag mitteilte. Durchgeführt wurde die Studie von dessen Virologielabor in Spiez. Die neue Karte vervollständige die bisherige Risikoeinschätzung, hält das VBS fest. Allerdings stelle sie eine Momentaufnahme dar. Eine Verallgemeinerung auf eine ganze Region oder über einen längeren Zeitraum lasse sich daraus nicht ableiten. (SDA)
www.zecken.tagesanzeiger.ch

Neue Zürcher Zeitung

FSME-Virus-infizierte Zecken auch im Wallis

Wissenschaftler vom Labor Spiez finden neue Endemiegebiete

Verbreitung der von Zecken verursachten Hirnhautentzündungen



Eine neue Karte zeigt, wo in der Schweiz überall Zecken lauern, die bei Befall zu einer Hirnhautentzündung führen können. Dass sich das Kompetenzzentrum für ABC-Waffen für diese Frage interessiert, hat seine Gründe.

Alan Niederer

Das Virus, das beim Menschen eine sogenannte Zecken-Hirnhautentzündung oder Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) auslösen kann, ist in der Schweiz verbreiteter als bisher angenommen. Das zeigt eine neue Studie, die Virologen vom Labor Spiez durchgeführt haben. Die zum Departement für Verteidigung, Bevölkerungsschutz und Sport (VBS) gehörende Institution veröffentlichte am Dienstag ihre Verbreitungskarte, die erstmals auf der tatsächlichen Infektionsrate von untersuchten Zecken basiert. Die vom Bundesamt für Gesundheit (BAG) in regelmässigen Abständen herausgegebenen

Karten zu den sogenannten FSME-Endemie-Gebieten berücksichtigen hingegen die gemeldeten Krankheitsfälle, wie das VBS schreibt.

Karte als Momentanaufnahme

Nach der neuen Darstellung finden sich mit dem FSME-Virus infizierte Zecken auch in Gebieten, die bisher als virusfrei galten. So konnten die Dissertantin Rahel Gäumann und ihre Forscherkollegen vom Labor Spiez auch im Wallis infizierte Zecken nachweisen, und zwar in Raron und in Salgesch. Befallene Parasiten fanden sich ausserdem in Regionen, aus denen bisher nur einzelne Krankheitsfälle gemeldet wurden, so etwa in Freienbach und Gersau (beide Kanton Schwyz) und in Oensingen im Kanton Solothurn.

Wie Gäumann erklärt, will die neue Risikokarte des VBS die BAG-Publikationen nicht konkurrenzieren, sondern diese vielmehr ergänzen. Denn auch ihre Karte, die im Wesentlichen die bekannten Endemiegebiete bestätigt, stel-

le nur eine Momentanaufnahme dar, die sich auf einen Zeitpunkt in der Vergangenheit und einzelne Standorte beziehe. Eine Verallgemeinerung auf eine ganze Region oder über einen längeren Zeitraum sei deshalb nicht möglich. Dies trifft besonders für das Tessin zu. Aus Zeitmangel habe nämlich auf die Untersuchung der Zecken in diesem Kanton verzichtet werden müssen, sagt die Forscherin.

Potenzieller B-Kampfstoff

Warum sich das Labor Spiez, das sich auf seiner Homepage als nationales Fachinstitut für den Schutz vor atomaren, biologischen und chemischen Bedrohungen und Gefahren bezeichnet, überhaupt für Zecken und die von ihnen übertragenen Krankheiten interessiert, hat seine Gründe, wie Gäumann erklärt. Weil es gegen die FSME-Viren keine Behandlung gebe – dies im Gegensatz zu den ebenfalls von Zecken übertragenen Borrelien-Bakterien –, würden die Erreger als mögliche biologische

Kampfstoffe angesehen. Mehr über sie in Erfahrung zu bringen, sei deshalb, nebst der Identifikation von neuen Endemiegebieten, ein weiteres Ziel ihrer Untersuchung gewesen. Die Forscher haben deshalb die aus den Zecken isolierten Viren im Labor vervielfältigt und konserviert. Damit verfüge das Labor Spiez nun über eine Sammlung der in der Schweiz vorkommenden FSME-Virus-Typen, sagt Gäumann.

BAG empfiehlt Impfung

Die Infektion mit dem FSME-Virus verläuft in den meisten Fällen unmerklich, oder es treten unspezifische grippeähnliche Beschwerden auf. In 5 bis 15 Prozent der Fälle kann es aber zu einer Reizung des Gehirns und der Hirnhäute kommen (Meningoenzephalitis). Dann reichen die Symptome von Kopfschmerzen und Schwindel

über Konzentrationsstörungen bis zu Lähmungserscheinungen, die ganz selten auch tödlich verlaufen können. Aus diesem Grund empfiehlt das BAG seit 2006 allen Personen, die in Endemiegebieten leben und älter als sechs Jahre sind, sich gegen das FSME-Virus impfen zu lassen. Jüngere Kinder brauchen sich nicht immunisieren zu lassen, da bei ihnen schwerere Krankheitsverläufe äusserst selten seien.

QUOTIDIANO DIPARTIMENTO DELLA SANITÀ ITALIANA
CORRIERE DEL TICINO

Zecche, nuovi focolai d'infezione

Pubblicato uno studio sulla loro presenza nel nostro Paese

Le aree svizzere in cui sono presenti zecche portatrici del virus della meningoencefalite sono più numerose del previsto – Non si segnalano casi a sud delle Alpi

■ **BERNA** Uno studio pubblicato ieri dal Laboratorio di Spiez ha permesso di individuare nuovi focolai di infezione inerenti il virus della meningoencefalite (MEVE) anche in zone sinora considerate esenti dalla malattia. È il caso delle regioni vallesane di Turtig-Raron e di Salgesch. Non si segnalano invece casi a sud delle Alpi. La ricerca si basa sul tasso d'infezione effettivo delle zecche e viene a completare la precedente mappatura che indi-

cava le zone a rischio fondandosi sui casi di MEVE dichiarati. Lo studio è una semplice istantanea di una situazione in perenne mutamento, precisa il Laboratorio di Spiez. Non può dunque essere generalizzata ad un'intera regione. Per esaminare la presenza di MEVE in Svizzera, i ricercatori hanno raccolto zecche in varie regioni del Paese individuando gli esemplari portatori del virus. A Cudrefin, per esempio, sulle rive del lago di Neuchâtel, un solo animale

sui 500 prelevati si è rivelato essere infetto. L'istituto ricorda che la meningoencefalite da zecche è una malattia virale che colpisce il sistema nervoso centrale.

Se nel 70% dei casi la patologia è asintomatica e passa inosservata, nel 30% insorgono sintomi influenzali entro 1-2 settimane dalla puntura. Questi spesso evolvono verso una guarigione definitiva e solo nel 15% dei pazienti il virus arriva effettivamente al sistema nervoso centrale. Anche se la malattia si rivela fatale solo nell'1 per cento dei casi, l'Ufficio federale della sanità pubblica raccomanda la vaccinazione alle persone che risiedono in aree dove la malattia è endemica.

Walliser
☆☆ Bote

Die gefährlichsten Zecken

FSME-infizierte Zecken kommen laut einer Studie auch in Raron und Salgesch vor



Raron/Salgesch. – Auch im Oberwallis gibt es Zecken, die FSME-Viren tragen. Das zeigt eine neue Studie. Grund zur Panik besteht nicht.

Das Labor Spiez hat im Rahmen einer Studie zur viralen Zecken-Hirnhautentzündung (FSME) in der Schweiz eine Verbreitungskarte erstellt. Diese basiert auf der tatsächlichen Infektionsrate der Zecken mit dem Virus und vervollständigt damit die bisherige Risikoeinschätzung, die sich auf Krankheitsfälle stützt. Allerdings stellt sie eine Momentaufnahme dar, die sich auf den genauen Zeitpunkt und die spezifischen Orte bezieht, die in der Studie untersucht wurden. Eine Verallgemeinerung auf eine ganze Region oder über einen längeren Zeitraum lässt sich daraus nicht ableiten.

FSME-Herde in Raron und Salgesch
Trotzdem liefert die Untersuchung wichtige neue Erkenntnisse. So konnten zum Beispiel erstmals zwei FSME-Herde im Kanton Wallis identifiziert werden, welcher bis anhin als FSME-frei galt. Konkret wurden Collombey-Muraz, Vernayaz und Sitten anhand von 900 Zecken untersucht. Keine war FSME-positiv. Im Oberwallis testete man 135 Zecken in Salgesch und 466 in Raron. An beiden Standorten war je eine Zecke FSME-positiv. Dass es im Unterwallis keine Fälle gibt, sei wahrscheinlich reiner Zufall, sagt Rahel Gäumann vom Virologie-Labor Spiez. Ebenso konnten Infektionen in Gebie-

ten in der Deutschschweiz nachgewiesen werden, aus welchen nur isolierte Krankheitsfälle gemeldet wurden. Es sei sehr interessant festzustellen, dass es auch FSME-Herde gebe, wo man bisher keine vermutet habe, merkt Gäumann an. Überraschend sei dies aber nicht, weil die Bedingungen ja insgesamt im Wallis nicht völlig anders seien als in der Deutschschweiz, sagt Gäumann: «Dass Zecken immer öfter auch in höher gelegenen Gebieten vorkommen, hat seinen Grund in der Klimaerwärmung. Es ist ihnen auch in höheren Lagen wohl.»

Wahrscheinlichkeit bei 1:1000

Der Nachweis von FSME-Herden in Raron und Salgesch bedeute auch nicht, dass man nun im ganzen Talgrund mit Herden rechnen müsse: «Wie verbreitet der Bestand ist, können wir nicht sagen, weil wir nur bestimmte Gebiete untersucht haben. FSME-Herde sind geografisch gesehen sehr beschränkt.» Seitens des Kantons sind nun weitergehende Studien geplant. Ergebnisse sind vor dem Herbst nicht zu erwarten. Die Durchseuchungsrate ist mit einem halben Prozent natürlich sehr tief. Panik, so Gäumann, sei also fehl am Platz. «Wenn man an einen Ort geht wie eben jetzt in Raron, ist die Wahrscheinlichkeit, dass man nach einem Zeckenstich eine Hirnhautentzündung bekommt, 1 zu 1000. Und das selbst an einem Ort, wo diese FSME-Herde nachgewiesen wurden.» Im Kanton Zug habe man in Steinhausen so einen Naturherd gefunden. Der letzte

Krankheitsfall liege aber zehn Jahre zurück.

Die Zecken-Hirnhautentzündung (FSME) ist eine virale Erkrankung des zentralen Nervensystems. Bei etwa 70 Prozent der infizierten Personen verläuft die Ansteckung ohne Symptome und bleibt darum unbemerkt.

Virale Erkrankung mit tödlichen Folgen

In den anderen Fällen entwickeln sich ein bis zwei Wochen nach dem Zeckenbiss grippeähnliche Symptome wie Fieber, Müdigkeit, Kopf- und Gelenkschmerzen. Diese Phase dauert etwa ein bis acht Tage und in den meisten Fällen endet diese mit einer definitiven Heilung. Bei etwa 15 Prozent der infizierten Personen entwickelt sich eine zweite Krankheitsphase, in welcher die Viren das zentrale Nervensystem befallen. Die Folge dieser Hirnhaut-, Hirn- und/oder Rückenmarksentzündung sind starke Kopfschmerzen, Übelkeit, Schwindel, Konzentrations-, Schluck-, Sprech- und Gehstörungen. Bei sehr schweren Verlaufsformen treten Lähmungen der Arme, Beine oder Gesichtsnerven auf. Etwa ein Prozent der Betroffenen stirbt an der Krankheit. Es gibt keine spezifische Therapie gegen die Zecken-Hirnhautentzündung, aber man kann sich mit einer Impfung wirksam gegen diese Krankheit schützen. Das Bundesamt für Gesundheit (BAG) empfiehlt allen Personen in sogenannten FSME-Endemiegebieten, sich gegen die Krankheit impfen zu lassen. hbi

Zürichsee-Zeitung



Die Resultate der Studie zur viralen Zecken-Hirnhautentzündung (FSME) des Labors Spiez für den Zürichsee: Freienbach galt bisher nicht als Risikogebiet – ein Irrtum.

Zecken Neue Gefahrenkarte zeigt FSME-Herde am Zürichsee

Infizierte Zecken gibts fast überall

Virologen haben tausende von Zecken untersucht. Fazit: Die gefährlichen FSME-Viren sind weiter verbreitet als angenommen.

Martin Steinegger

Zecken, die das FSME-Virus (Zecken-Hirnhautentzündung) in sich tragen, kommen auch ausserhalb der bisher bekannten Risikogebiete vor: Zu diesem Schluss kommt eine gestern veröffentlichte Studie des Virologie-Labors Spiez. Speziell für die Region Zürichsee zeigt die Studie interessante Erkenntnisse. So wurde ein FSME-Herd auf dem Gebiet der Gemeinde Freienbach gefunden – diese Gegend galt bisher nicht als Risiko-

kogebiet. Weitere Herde fanden die Forscher in Langnau am Albis und Zollikon. Keine FSME-Infizierungen stellte das Labor hingegen in Horgen fest – obwohl dort fast 500 Zecken untersucht wurden. Das überrascht: Speziell der Horgnerberg galt bisher als gefährlich.

Die Virologen des Labors Spiez untersuchten im Rahmen der Studie Gebiete in der ganzen Schweiz. In über 900 Arbeitsstunden sammelten sie tausende von Zecken, die später nach Spuren des FSME-Virus untersucht wurden. «Es ist eine sehr aufwändige, aber auch sehr aussagekräftige Methode», sagt Rahel Gäumann von der Abteilung Virologie des Labors Spiez. Durch dieses Vorgehen sei es möglich, die FSME-Herde direkt vor Ort zu lokalisieren – die an-

hand der Studie neu erstellte Gefahrenkarte basiert also auf der tatsächlichen Infektionsrate der Zecken mit dem gefährlichen Virus.

«Nur eine Momentaufnahme»

Zur Erstellung von Gefahrenkarten stütze sich das Bundesamt für Gesundheit (BAG) bisher fast nur auf medizinische Daten. Überall dort, wo ein Arzt einen Patienten mit einer FSME-Erkrankung diagnostizierte, gab es einen Vermerk. Diese Methode hat zwar ebenfalls eine gewisse Aussagekraft, sie ist aber ungenau. «Meistens wissen die Leute, wenn sie mit Beschwerden zum Arzt gehen, nicht mehr genau, wo sie von einer Zecke gestochen wurden», sagt Rahel Gäumann.

Allerdings sind auch die Resultate der neuen Studie des Spiezer Labors mit einer gewissen Vorsicht zu interpretieren. «Unsere Untersuchung stellt nur eine Momentaufnahme dar», betont Gäumann. FSME-Herde treten bei Zecken lokal und sehr isoliert auf. Die Durchseuchungsrate, also die Prozentzahl der Zecken, die das FSME-Virus in sich tragen, liegt im

Schnitt bei deutlich unter 1 Prozent. So könnte sich auch das «Nullresultat» in Horgen erklären. «Es ist durchaus möglich, dass einige hundert Meter entfernt von dem Ort, an dem wir gesucht haben, FSME-Herde vorhanden sind – nur haben wir diese schlichtweg verfehlt», sagt sie. Rahel Gäumann versteht die Gefahrenkarte des Labors Spiez deshalb als Ergän-

zung und nicht als Konkurrenz zu den bisher existierenden Karten. «Eine für uns wichtige Erkenntnis aus der Studie ist, dass FSME-Herde durchaus auch ausserhalb der bisher vermuteten Risikogebiete auftreten können.»

www.vbs.ch

Sarganserländer

Melser und Stadtner Zecken tragen den FSME-Virus nicht

Im Rahmen einer Studie zur Zecken-Hirnhautentzündung sind auch Gebiete in Mels und Walenstadt untersucht worden. Keine der untersuchten Zecken trug dabei das FSME-Virus. Entwarnung kann dennoch nicht gegeben werden.

Von Jerry Gadiant

Sarganserland. – Das Labor Spiez – eine Fachstelle des Bundesamtes für

Bevölkerungsschutz – hat eine Verbreitungskarte der Viren erstellt, die auf der tatsächlichen Infektionsrate von Zecken basiert. Die bisher existierende Risikokarte stützte sich auf gemeldete Krankheitsfälle. Im Sarganserland sind Zecken in Mels und in Walenstadt untersucht worden. Bei keiner der 674 in Mels und 663 in Walenstadt eingesammelten und im Labor geprüften Zecken konnte dabei das FSME-Virus nachgewiesen wer-

den.

Nach wie vor Hochrisikogebiet

Das bedeutet nun aber nicht, dass für diese beiden Orte oder gar das Sarganserland Entwarnung gegeben werden könnte: Gemäss einer Medienmitteilung stellt die Studie «eine Momentaufnahme dar, die sich auf den genauen Zeitpunkt und die spezifischen Orte bezieht, die untersucht worden sind. Eine Verallgemeinerung auf eine ganze Region oder über ei-

nen längeren Zeitraum lässt sich daraus nicht ableiten.»

Tatsächlich zählen die Gemeinden Mels, Sargans und Vilters-Wangs wie auch angrenzende Gemeinden der Bündner Herrschaft sowie des Fürstentums Liechtenstein schon seit Jahren als FSME-Hochrisikogebiet. Die neue Karte ist denn auch als Ergänzung zur bisherigen Risikoeinschätzung gedacht. Denn die neue Studie hat verschiedene Gebiete als FSME-Herde identifiziert, die bisher als frei von Infektionen galten.

Das Bundesamt für Gesundheit jedenfalls empfiehlt nach wie vor allen Personen in sogenannten FSME-Endemiegebieten, sich gegen die

Krankheit zu schützen. Die Zecken-Hirnhautentzündung ist eine virale Erkrankung des zentralen Nervensystems. Bei etwa 70 Prozent der infizierten Personen verläuft die Ansteckung ohne Symptome, doch etwa ein Prozent der Infizierten stirbt an der Krankheit. In den anderen Fällen entwickeln sich ein bis zwei Wochen nach dem Zeckenstich grippeähnliche Symptome, die nach einigen Tagen wieder verschwinden. Bei etwa 15 Prozent der Infizierten kommt es zu einer zweiten Krankheitsphase, in der Viren das zentrale Nervensystem befallen. Bei sehr schweren Verlaufsformen treten Lähmungen der Arme, Beine oder Gesichtsnerven auf.

Körper auf Zecken absuchen

Eine weitere Krankheit, die von Zecken übertragen wird – jedes dritte dieser Tierchen ist damit infiziert, und das ganze Sarganserland gilt als Risikogebiet –, ist die Borreliose. Jährlich erkranken daran in der Schweiz zwischen 3000 und 5000 Personen. Gegen Borreliose ist keine Impfung möglich; wird sie rechtzeitig erkannt, kann sie jedoch gut antibiotisch behandelt werden. Jedenfalls empfiehlt es sich, nach einem Aufenthalt im Freien und in einem Zeckengebiet den ganzen Körper auf die unerwünschten kleinen Blutsauger abzusuchen.

Unter die Haut gegangen

Gefährliche Zecken im Vormarsch

FRANCESCO WELTI

Erstmals hat das Virologie Labor Spiez untersucht, wo Erreger der gefährlichen Zeckenhirnhaut-Entzündung vorkommen. Anders als auf der existierenden Risikokarte, die sich auf gemeldete Krankheitsfälle von Menschen abstützt, taucht in der Studie auch Alpnach als gefährdetes Gebiet auf.

■ **Gesundheit** – Das Bundesamt für Gesundheit (BAG) veröffentlicht jährlich eine Karte mit Gebieten aus denen Fälle von Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME), wie die Krankheit genau heisst, bekannt sind. In Nidwalden sind das Stans, Buochs und der Bürgenstock, in Obwalden Kerns sowie Teile des Stanserhorns auf beiden Kantonsseiten. Aufgrund der Studie des Labors in Spiez muss das Bild über die Befallsgebiete in der Schweiz nun revidiert werden, denn in bisher von den gefährlichen Zecken-Viren als unberührt geführten Regionen wie dem Wallis sind Infektionen nachgewiesen worden. Auch im Hinterbergwald in Alpnach ist ein solcher Fund erfolgt, wie Rahel Gäumann vom Virologie Labor Spiez gegenüber der ONZ bestätigt: Von 384 gefangenen Zecken trug eine das gefährliche Virus in sich.

Bekannte Befallsgebiete

Gesammelt haben die Forscher im Auftrag des Eidgenössischen Departements für Verteidigung, Bevölkerungsschutz und Sport (VBS) auch in Beckenried, Engelberg, Giswil, Kerns, Stans, Stansstad und Wolfenschiessen. Obwohl bekannte Befallsgebiete darunter waren, fanden die Virologen keine weiteren infizierten Zecken: «Wir sind nur punktuell auf die Suche gegangen», erklärt das Gä-

umann, «Herde kommen aber auf räumlich sehr beschränkten Standorten vor, deshalb könnten ganz in der Nähe trotzdem Zecken mit FSME leben.» Vorsicht vor Zecken ist in den Wäldern also auf jeden Fall geboten: Die Gefahrenkarte ist nur eine Momentaufnahme ohne Anspruch auf Vollständigkeit.

62'343 Zecken gefangen

Der Aufwand für die Studie war enorm. «Allein schon die Zecken zu sammeln, hat mehr als 900 Stunden gedauert.» 62'343 der Tierchen, die sich so gerne an der Haut festsaugen, sind den Forschern in die Hände geraten, annähernd 3000 in den Ortschaften Nidwaldens und Obwaldens. Wo FSME-Epidemien vorkommen, empfiehlt das BAG allen Personen, sich zu impfen. Die Zeckenhirnhautentzündung (FSME) ist eine virale Erkrankung des zentralen Nervensystems. Wer davon befallen ist, merkt es meist nicht: Bei bis zu 15 Prozent der infizierten Personen greifen die Viren aber das zentrale Nervensystem an, was beispielsweise zu Hirnhautentzündung führen kann. Obwohl die Studie neue Erkenntnisse erbracht hat, wird es vorläufig eine einmalige Aktion bleiben, weil der Aufwand dafür zu gross war. «Es hat sich aber gezeigt, dass die Gefahrenkarte nicht vollständig ist, daher sind unsere Erkenntnisse mit der Karte des BAG zu kombinieren», sagt Rahel Gäumann. Die Frühsommer-Meningoenzephalitis ist in Europa auf dem Vormarsch. Die Häufigkeit der Erkrankungen in der Schweiz hat von rund 100 Fällen pro Jahr vor einem Jahrzehnt deutlich auf 200 bis 250 (2005/06) zugenommen.

Nr. 100869, online seit: 12. Mai – 07.50 Uhr

DIE SÜDOSTSCHWEIZ

AUSGABE GRAUBÜNDEN

Auch in Graubünden stechen wieder infizierte Zecken

Von Stefanie Studer

In Graubünden sind fast 2000 Zecken auf den FSME-Virus getestet worden, welcher zu einer Zecken-Hirnhautentzündung führen kann. Alle Befunde waren negativ. Trotzdem gibt es keine Entwarnung für Spaziergänger.

Chur. – Wer in Graubünden durch Wald und Wiesen streift, muss auch in diesem Sommer mit FSME-infizierten Zecken rechnen. Dies obwohl eine Studie des Eidgenössischen Departementes für Verteidigung, Bevölkerungsschutz und Sport (VBS) und dessen Virologie-Labor theoretisch eine Entwarnung gibt. Schweizweit wurden Zecken gefangen und auf das Virus überprüft, welches eine Zecken-Hirnhautentzündung auslösen kann. Mit dem Resultat, dass in mehreren Kantonen FSME-infizierte Zecken verbreiteter sind, als bisher angenommen wurde.

In Graubünden wurden ebenfalls an vier Orten Zecken eingefangen und auf das Virus geprüft – im Raum Chur

397 Zecken, in Fläsch 625, in Seewis 685 und in Zizers 257. Keines der Tierchen war infiziert, woraus das Virologie-Labor des VBS die Prävalenz auf null Prozent schätzt, wobei die neue Gefahrenkarte nur eine «Momentaufnahme» darstelle. Eine Verallgemeinerung über einen längeren Zeitraum lasse sich nicht ableiten.

Kantonsarzt kritisiert Studie

Der Bündner Kantonsarzt Martin Mani erachtet das Ergebnis der Studie als kritisch. Genauso gut hätten in Graubünden infizierte Zecken gefunden werden können, wonach das Vorkommen des FSME-Virus auch höher geschätzt worden wäre. «Die Studie ändert für uns überhaupt nichts, da die Aussagekraft zu klein ist», so Mani. Besonders in der Bündner Herrschaft und im Prättigau kommen viele Zecken vor. In diesen Gebieten empfiehlt Mani der Bevölkerung deshalb auch, sich gegen das Virus impfen zu lassen. In den vergangenen Jahren wurden jedes Jahr zwei bis vier Personen in Graubünden mit dem FSME-Virus angesteckt. In diesem Jahr zwar

noch nicht. «Ich nehme aber an, dass auch in diesem Jahr wieder Menschen von infizierten Zecken gestochen werden», sagt Mani.

Unterschiedliche Krankheiten

Bei rund 70 Prozent der Personen verläuft die Ansteckung ohne Symptome. In anderen Fällen können die Folgen von grippeähnlichen Symptomen bis hin zu Lähmungen der Arme, Beine oder Gesichtsnerven führen. Das Bundesamt für Gesundheit (BAG) empfiehlt eine Impfung denjenigen, welche in einem Risikogebiet leben. Unterschieden werden muss bei der zweiten von Zecken übertragenen Krankheit, der Lyme-Borreliose. Gegen Borreliose könne man sich nicht impfen lassen, erklärt Kantonsarzt Mani.

Nach Spaziergängen in Zeckengebieten sollte man den eigenen Körper immer auf Zecken überprüfen. Bei Stichen sind die Tiere rasch mit einer Pinzette zu entfernen. Danach sollte die Stichstelle desinfiziert werden, wie das BAG rät.

Für Mani bleiben die Zecken gefährlich

Kantonsarzt Martin Mani warnt weiterhin vor FSME-infizierten Zecken – obwohl eine schweizerische Studie eigentlich Entwarnung gibt.

Von Stefanie Studer

Chur. – Der Kantonsarzt Martin Mani empfiehlt der Bündner Bevölke-

rung, auch in diesem Sommer gut auf Zeckenstiche zu achten. In Gebieten wie der Bündner Herrschaft und dem vorderen Prättigau leben besonders viele der kleinen Blutsauger. Gefährlich kann es dann werden, wenn die Zecken mit dem FSME-Virus infiziert sind. Dieses kann zu einer Zecken-Hirnhautentzündung führen.

Mani rechnet auch in diesem Jahr wieder mit Infizierungen, obwohl ei-

ne Studie des Eidgenössischen Departementes für Verteidigung, Bevölkerungsschutz und Sport (VBS) und dessen Virologie-Labor die Bündner eigentlich aufatmen lässt. Bei der Studie wurden rund 2000 Zecken aus Graubünden auf den FSME-Virus getestet. Kein einziges der Tierchen war positiv, worauf das VBS die Häufigkeit im Kanton auf null Prozent schätzt.

Bieler Tagblatt

Eine gute Nachricht ist auch eine Nachricht

**NIKLAUS
BASCHUNG**

Die Plastikflasche mit dem Hände-Desinfektionsmittel steht immer noch im Gemeinschafts-Lavabo. Sie ist halbvoll. Seit einem halben Jahr. Wie ein Mahnmal. Zum Gedenken an eine Krankheitsepidemie, die sogenannte Schweinegrippe, die nie eingetreten ist. Zur Erinnerung an Sorgen und Ängste, die uns monatelang beschäftigt haben. Wie könnten wir es uns jemals verzeihen, wenn sich zum Beispiel Kinder oder schwangere Frauen bei uns angesteckt hätten? Wir sahen uns als Bedrohung von uns selber.

Und die Gefahren, sie verfolgen uns überall, auch von dort, wo sie gar nicht vermutet werden. Wenn in einem fernen Land – sagen wir in Kasachstan oder Niger – ein Flugzeug abstürzt, heisst es in den Nachrichten zur Beruhigung, dass wahrscheinlich keine Schweizer an Bord gewesen seien. Doch weshalb soll mich dies beruhigen und weshalb sind dort überhaupt Schweizer mitgeflogen? Das ist ja unerhört, dass ich in Niger beinahe ums Leben gekommen bin, dabei weiss ich nicht einmal, wo dieses Land genau liegt. Saisongerecht zur beginnenden Waldhütten-Festzeit alljährlich dann die Horrormeldungen von der Zeckenfront, mit hundertfach vergrösserten Leibern dieser grausig blutrünstigen Milbenart.

Oder wollen Sie einmal eine gute Nachricht dazu hören? Zur Abwechslung – kann ja nicht schaden. Forscher des Virolo-

gie-Labors Spiez haben in der Schweiz die Infektionsrate von Zecken mit dem Hirnhautentzündungs-Virus (FSME) untersucht und eine Karte erstellt. Diese liefert neue Erkenntnisse zur Verbreitung des Virus. Das ist jetzt noch nicht die gute Nachricht, haben Sie Geduld, die kommt erst: In Aarberg wurden 173 Zecken auf den Virus untersucht, die Anzahl FSME-positiver Zecken belief sich auf null; in Busswil wurden 578 Zecken auf den Virus untersucht, die Anzahl FSME-positiver Zecken belief sich auf null; in Orpund wurden 589 Zecken auf den Virus untersucht, die

**Die allergrösste
Bedrohung jedoch,
das ist diese
permanente
Angstmacherei
vor praktisch allen
Ereignissen, die das
menschliche Leben
letztlich ausmachen.**

Anzahl FSME-positiver Zecken belief sich auf null; in Gampele wurden 470 Zecken auf den Virus untersucht, die Anzahl FSME-positiver Zecken belief sich auf null; in Grenchen wurden 588 Zecken auf den Virus untersucht, die Anzahl FSME-positiver Zecken belief sich auf null. Zusammengefasst: In allen Gemeinden im Seeland und der näheren Umgebung, die in die Untersuchung einbezogen wurden, konnten keine infizierten Zecken erfasst werden. Entsprechend wird die tatsächliche Befallsrate an diesen Orten eingeschätzt: Sie liegt bei null Pro-

zent.

(Siehe unter:
www.vbs.admin.ch/internet/vbs/de/home/documentation/news)

Aber eine gute Nachricht ist eigentlich gar keine erwähnenswerte Nachricht. Deshalb hat sich das Schweizer Fernsehen bei der Berichterstattung zu diesem Forschungsergebnis vor allem auf das Wallis konzentriert. Dort wurden doch bei insgesamt 12 000 untersuchten Zecken tatsächlich zwei infizierte entdeckt, eine in Salgesch und eine in Raron. Ein überraschender Befund, weil sich im Wallis noch nie ein Walliser oder eine Walliserin durch einen Zeckenbiss einen Hirnhautentzündungs-Virus eingefangen hat. Aber jetzt wird es nur noch eine Frage der Zeit sein. Morgen vielleicht oder übermorgen, und zack, beissen sie sich fest, diese Viecher.

Die allergrösste Bedrohung jedoch, das ist diese permanente Angstmacherei vor praktisch allen Ereignissen, die das menschliche Leben letztlich ausmachen. Und dagegen helfen nur noch zwei Wundermittel: Das respektlose Lachen und die Freude an den schönen Dingen dieser Welt. Zuvor gilt es nur noch zwei Grundängste zu überwinden: die Geliphobie, die erhöhte Furcht vor dem Lachen, und die Venustraphobie, die Angst vor schönen Frauen. Frauen haben umgekehrt offenbar keine Angst vor schönen Männern. Jedenfalls existiert dazu kein eigener Fachbegriff. Soll mir recht sein.

Engadiner Post

POSTA LADINA

Im Wald auf Shorts und Sandalen verzichten

Ein minimaler Schutz vor Zecken empfiehlt sich auch in Südbünden

MARIE-CLAIRE JUR

In Südbünden kommen Zecken zwar auch vor, doch bisher ist noch kein Fall von Frühsommer-Hirnhautentzündung festgestellt worden. Lyme-Borreliose hingegen kommt vor. Bei Ausflügen in den Wald soll man sich deshalb versehen.

Die Zecken sind in der Schweiz im Vormarsch. Und damit verbreitet sich auf der Alpennordseite die Gefahr, bei einem Zeckenbiss mit Viren infiziert zu werden, die die Frühsommer-meningoenzephalitis (FSME) übertragen. Bei etwa 70% der befallenen Per-

sonen verläuft die Ansteckung ohne Symptome und bleibt unbemerkt. In andere Fällen entwickeln sich ein bis zwei Wochen nach dem Zeckenstich grippeähnliche Symptome wie Fieber, Müdigkeit oder Kopf- und Gelenks-schmerzen. In den meisten Fällen endet diese erste Krankheitsphase mit einer definitiven Heilung. In 15% der infizierten Fälle aber entwickelt sich eine zweite Phase, in der das Virus das Nervensystem befällt und verschiedene Störungen, darunter auch Schluck-, Geh- oder Sprechstörungen hervorruft. Bei sehr schwerem Verlauf können Lähmungen der Extremitäten oder der Gesichtsnerven beobachtet werden, ein Prozent der Infizierten

stirbt an der Krankheit. Eine spezifische Therapie gibt es nicht, Schutz vor der Krankheit bietet einzig ein Impfstoff.

Gemäss einer neuen Studie, die Virologen des Labors Spliez gemacht haben, dringen Zeckenviren auch in Gebiete vor, die bisher als virenfrei galten. Auch im Bündner Rheintal und im unteren Prättigau wurden Untersuchungen gemacht, die eine erhöhte Präsenz von FSME im Kanton Graubünden belegen sollen. Kantonsarzt Martin Mani stellt diese Studien aber in Frage, da sie in seinen Augen von der Erhebungsmethode und der statistischen Aussagekraft her nicht relevant sind. Mögen sich die Zecken auch ausbreiten. Im Kanton

Graubünden sind die FSME-Fallzahlen gesunken: Zwischen 2005 und 2008 von sechs auf zwei Fälle; 2009 wurden drei Fälle verzeichnet.

Keine FSME-Fälle in Südbünden

Für FSME herrscht in der Schweiz Meldepflicht. Ärzte und Labors sind gehalten, dem Kantonsarzt Bericht zu erstatten, wenn im Patientenblut entsprechende Viren gefunden wurden. Über diese wenigen Fälle hinaus, die an einer Hand abgezählt werden können, vermutet Mani eine Dunkelziffer, die schwer zu definieren ist.

Aus dem Engadin und den angrenzenden Südtälern ist Mani kein Fall von einer durch einen Zeckenbiss hervorgerufenen Frühsommerhirnhautentzündung bekannt. Bei einer im Oberengadin diagnostizierten Person stellte sich heraus, dass sie sich am Zürichsee infiziert hatte, also das Virus gleichsam in die Region eingeschleppt hatte. Da Südbünden also keine Endemiegebiete und auch keine Einzelfälle für FSME kenne, empfiehlt der Kantonsarzt der Bevölkerung auch nicht,

sich gegen diese Zeckenhirnhautentzündung impfen zu lassen. «Wer aber im Unterland an Orientierungsläufen teilnimmt, als Waldbiologe für eine Studie dauernd auf dem Waldboden liegt oder sich aus anderen Gründen oft im Wald aufhält, sollte sich impfen lassen», meint Mani. Diese Impfung könne jeder Hausarzt machen.

Lyme-Borreliose

Für eine andere, durch einen Zeckenstich übertragene Krankheit gibt es weder eine Schutzimpfung noch eine Meldepflicht. Wieviele Fälle von Lyme-Borreliose im Kanton Graubünden auftreten, weiss Mani nicht. Diese Infektion ist weit häufiger als die Frühsommermeningoenzephalitis. Jährlich werden in der Schweiz zwischen 2000 und 3000 Erkrankungsfälle gezählt. Dazu kommt noch eine Dunkelziffer.

Im Gegensatz zur FSME macht die Lyme-Borreliose vor der Alpensüdseite nicht Halt und ist im Tessin und Südbünden durchaus präsent. Und das nicht erst seit gestern. Dr. med. Martin Büsing etwa, Bezirksarzt für den

Bezirk Inn, diagnostiziert im Unterengadin regelmässig zwischen vier bis sechs Fälle pro Jahr. Weniger oft, allenfalls hie und da, haben die Bezirksärzte Mauro Albertini (Puschlav) und Mario Lanfranchi (Bergell, Oberengadin) mit dieser Krankheit in ihren Praxen zu tun und von ihren Arztkollegen im Bezirk auch keine entsprechenden Hinweise erhalten.

Auch wenn Borreliose medikamentös behandelt werden kann, empfiehlt Mani der Bevölkerung, die sich im Wald aufhält, so genannte Expositionsprophylaxe zu betreiben, also lange Kleider (Hosen und Hemden), Socken und gutes Schuhwerk zu tragen. Auch gewisse Mückensprays (Antibrumm) halten Zecken fern. Zu Hause sollte man nach einem Aufenthalt im Wald den Körper (vorab in den Feuchtzonen) nach Zecken absuchen und falls solche entdeckt werden mit einer Pinzette sorgfältig herausziehen (nicht drehen) und danach die Einstichstelle desinfizieren.

Rontaler

Neue Studie zur Verbreitung der Zeckenhirnhaut-Entzündung überrascht Auch das Rontal hat seine Zecken

Zecken sind als Plagegeister wohl bekannt, als Auslöser von Hirnhautentzündung gefürchtet, doch bisher als im Rontal nicht «angesiedelt» betrachtet. Eine neue Studie zeigt: Sie sind auch bei uns – und können durchaus gefährlich sein.

er. Die alljährlich im Frühling wiederkehrenden Zeckenwarnungen sind bekannt. Manch Hundeliebhaber oder Katzenfreundin hatten schon die Aufgabe, ihre Lieblinge von diesem Blutsauger und Parasit zu befreien. Etliche haben sich auch schon gegen die Zecke impfen lassen, die eigentlich keine «Sie» ist, sondern im Volksmund «Gemeiner Holzbock» genannt wird. Bisher existiert auch eine Risikokarte, die sich auf gemeldete Krankheitsfälle stützt. In dieser Karte sind für den Kanton Luzern aber lediglich die Gemeinden Reiden, Langnau, Dagmersellen, Nebikon, Egolzwil, Kottwil, Sursee und Knutwil aufgeführt. Weit und breit wird da für das Rontal nichts befürchtet – obwohl Hirnhautentzündungen – sogar mit Todesfolge – auch in der Zentralschweiz vorgekommen sind.

Mit einer neuen Studie vom LABOR SPIEZ zur viralen Zeckenhirnhaut-Entzündung (FSME) – im Auftrag des Departements VBS erstellt – brachte nun eine Verbreitungskarte der Zeckenplage und der Viren auf der Basis der effektiven Infektionsra-

te bei Zecken. Die Studie konnte mehrere Infektionsherde identifizieren, die bisher als FSME-frei galten. Schweizweit wurden rund 60000 Zecken an über 160 Standorten untersucht. Dazu gehört nun auch Ebikon, wo mit 441 untersuchten Zecken – und einer FSME-infizierten – ein Hochrisikogebiet besteht. Und da es sich um eine Momentaufnahme mit Stichproben handelt, ist wohl davon auszugehen, dass sich die Zecken auch im übrigen Rontal aufhalten – vor allem in den Gebüsch- und Waldbereichen.

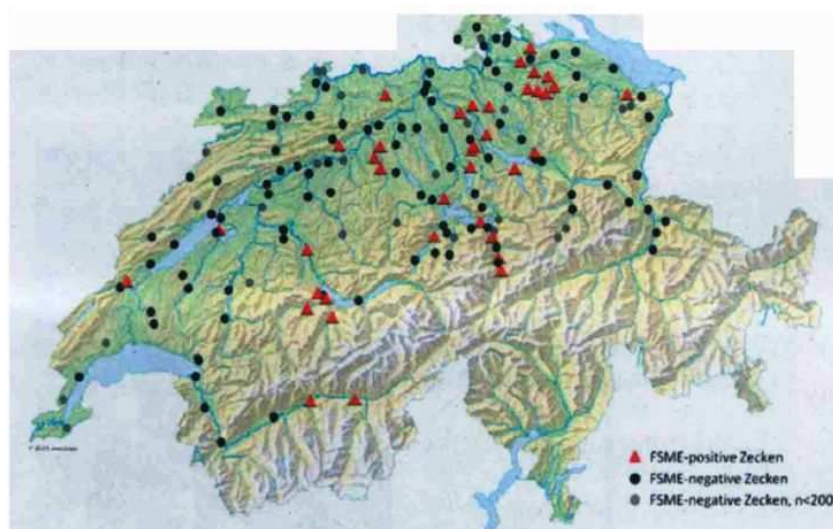
Die Zecke kann relativ einfach entfernt werden und der Stich ist in vielen Fällen harmlos. Doch: Eine mögliche Infizierung mit der Zeckenhirnhautentzündung (FSME) ist eine virale Erkrankung des zentralen Nervensystems. Bei etwa 70% der infizierten Personen verläuft die Ansteckung ohne Symptome und bleibt darum unbemerkt. In den anderen Fällen entwickeln sich ein bis zwei Wochen nach dem Zeckenstich grippeähnliche Symptome wie Fieber, Müdigkeit, Kopf- und Gelenkschmerzen. Diese Phase dauert etwa ein bis acht Tage und in den meisten Fällen endet diese mit einer definitiven Heilung. Bei etwa 15% der infizierten Personen entwickelt sich eine zweite Krankheitsphase, in welcher die Viren das zentrale Nervensystem befallen. Die Folge dieser Hirnhaut-, Hirn- oder Rückenmarksentzündung sind

starke Kopfschmerzen, Übelkeit, Schwindel, Konzentrations-, Schluck-, Sprech- und Gehstörungen. Bei sehr schweren Verlaufsformen treten Lähmungen der Arme, Beine oder Gesichtsnerven auf. Etwa 1% der Betroffenen stirbt an der Krankheit. Es gibt keine spezifische Therapie gegen die Zecken-Hirnhautentzündung, aber man kann sich mit einer Impfung wirksam gegen diese Krankheit schützen.

**Gefährlicher
Schmarotzer im Rontal**



er, Im Volksmund Gemeiner Holzbock genannt, sieht die Schildzecke *Ixodes ricinus* vor ihrem blutsaugenden Raubzug noch ganz niedlich aus.



Zeckenverbreitung im Kanton Luzern

Gemeinde	Anzahl untersuchte Zecken	Anzahl FSME-positive Zecken	Geschätzte Prävalenz
Emmen	381	0	0 %
Ebikon	441	1	0.23 %
Knutwil	442	0	0 %
Neuenkirch	404	0	0 %
Dagmersellen	545	3	0.55 %

Quelle: Studie zur Verbreitung der Zeckenhirnhaut-Entzündung, R. Gümnam, K. Mühlemann, M. Strasser, CM. Beuret; 2010



Zecken im Fricktal: Blutsauger sind aktiv

Frühsommer-Meningoenzephalitis und Borreliose sind Krankheiten, die von den kleinen Tieren übertragen werden

Die Berichte über Blutsauger, die sich im Wald, auf Feldern und auch in Hausgärten aufhalten, haben in den letzten Jahren wieder zugenommen: Zeckenalarm im Fricktal.

WALTER CHRISTEN

Wer sich viel im Freien aufhält, tut gut daran, sich gegen das FSME-Virus impfen zu lassen. Die Frühsommer-Meningoenzephalitis wird durch Zecken übertragen. Weil das Wetter in diesem Frühjahr lange schlecht war und nicht gerade zu ausgedehnten Waldspaziergängen eingeladen hat, ist es in der Region erst

zu wenigen Infektionen gekommen, die zu Hirnhaut- und Hirnentzündungen führen kann, wie die AZ in Erfahrung bringen konnte. Doch durch die wärmeren Temperaturen der letzten Tage ist nun Vorsicht geboten – die Zecken sind aktiv.

Schutzimpfung empfohlen

«Viele Leute wollen sich nicht der Gefahr einer Infektion aussetzen und lassen es deshalb gar nicht erst darauf ankommen. Vor allem Forstpersonal und Waldarbeiter sowie Hundebesitzer kommen in die Praxis und lassen sich impfen. Auch Jogger beugen vor und nehmen die Impfung in Kauf», hielt

Bezirksarzt-Stellvertreter Walter Ganz aus Mettau gegenüber der AZ fest. Dieses Jahr seien ihm noch nicht viele Fälle bekannt und noch keine Infektionen gemeldet worden. Aber erfahrungsgemäss nähmen die Arztbesuche wegen Zeckenstichen in den nächsten Tagen und Wochen zu. «Wir haben dem Rhein entlang ein gefährdetes Gebiet zwischen der Aaremündung und Kaiseraugst», so Ganz, der darauf hinwies: «Viel häufiger tritt die Borreliose auf, die durch solche Zecken übertragen werden, die mit Bakterien infiziert sind.»

Fälle im unteren Fricktal

Im unteren Fricktal sind die-

ses Frühjahr Fälle von Zeckenstichen, die ärztlich behandelt werden mussten, schon häufiger vorgekommen, wie in der Möhliner Praxis Andreas Schifferle zu erfahren war. Von dort geht ebenfalls die Empfehlung an die erwähnten Risikogruppen, sich gegen FSME impfen zu lassen. Generell ist zu sagen, dass die Fricktaler Bevölkerung in den letzten Jahren vermehrt auf die Risiken von Zeckenstichen aufmerksam gemacht wurde, was sich in einer gestiegenen Impfquote auswirkt. Nach der ersten Impfung ist nach ein paar Wochen eine zweite Spritze notwendig, und nach einem Jahr braucht es für die Erreichung

des vollen Impfschutzes noch eine dritte Injektion.

Im Rahmen einer Studie zur Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) in der Schweiz ist eine Verbreitungskarte der Viren erstellt worden (Karte auf dieser Seite). Laut dieser aktuellen Studie wurden zum Beispiel in der Region Baden 508 Zecken untersucht. Kein einziges der getesteten Tiere trug das FSME-Virus in sich. Anders sieht es hingegen bei der Borreliose aus, die in der ganzen Schweiz vorkommt. Laut dem Bundesamt für Gesundheit sind in der Schweiz rund 5 bis 30 Prozent, zum Teil sogar bis 50 Prozent der Zecken, mit Borreliose infiziert. Man geht davon

aus, dass in der Schweiz jährlich etwa 3000 Personen an Borreliose erkranken. Entsteht um einen Zeckenbiss eine Rötung in der Grösse eines 5-Franken-Stücks, könnte das der Hinweis auf eine Infizierung mit Borreliose sein. Dann ist ein Arzt aufzusuchen, damit der Zeckenstich behandelt werden kann.

Zecke langsam herausziehen

Hat sich eine Zecke festgebissen, soll sie mit einer Pinzette oder einer speziellen Zeckenzange hautnah gefasst und durch langsames Ziehen entfernt werden. Drehbewegungen sind nicht geeignet. Vorbehandlungen mit Öl, Gel, Feuer oder Zerquetschen sind zu unterlassen.



VERBREITUNG VON FSME Zeckenbefallsrate kann in den als «FSME-negative Zecken, n < 200» angegebenen Gebieten leicht abweichen.

Beobachter

ZECKEN

Neue Gefahr fürs Hirn

Mehr Risikogebiete: Virologen haben neue Zeckenpopulationen entdeckt, die die Hirnhautentzündung verbreiten. **Text: Balz Ruchti**

Der Bund hat eine aktuelle Studie zur Verbreitung der Zecken-Hirnhautentzündung – auch bekannt als Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) – veröffentlicht. Die neue Risikokarte basiert auf der tatsächlichen Verbreitung des Virus unter den Zecken. Bisher waren die Gefahrengebiete anhand von Krankheitsfällen erfasst worden. Die Forscher des Departements für Verteidigung, Bevölkerungsschutz und Sport (VBS) fanden jetzt erstmals auch im Wallis Virenherde, genauer: in Raron und Salgesch.

Die nachgewiesene Durchseuchung der Schweizer Zecken ist mässig, sie liegt durchschnittlich bei einem halben Prozent. «Das ist vergleichbar mit anderen Ländern», so Virologin Rahel Gäumann, die die Studie betreut. Die Studie sei allerdings nur eine Momentaufnahme, die keine Verallgemeinerung zulasse.

«Das ist kein Anlass zur Entwarnung», sagt auch Norbert Satz, Spezialist für Zeckenkrankheiten. Zwar verlaufe eine FSME-Infektion in den meisten Fällen mit leichten Symptomen oder gänzlich unbemerkt; bricht aber eine Hirnhaut-

entzündung aus, könne diese schwere und bleibende Schäden hinterlassen. «Grundsätzlich gilt: Je älter der Patient, desto dringender ist der Impfschutz», sagt Satz. Bei über 70-Jährigen liege die Invaliditätsrate bei 50 Prozent.

Umgekehrt verläuft die Krankheit umso glimpflicher, je jünger die infizierte Person ist. Kinder unter sechs Jahren müssen noch nicht geimpft werden – im Gegenteil: «Eine Infektion im frühen Alter führt zu einem Immunisierungsgrad, wie er mit keiner Impfung erreicht wird – und das fast ohne Symptome.»



Zehntausende Zecken wurden untersucht

Für die Studie wurden letzten Frühling an 165 Standorten rund 60 000 Zecken eingesammelt. Im Labor wurden die gefangenen Spinnentiere schockgefroren und auf FSME-Viren untersucht.

Ob und wie sich das Virus in der Schweiz verbreitet oder ob es im Wallis schon länger infizierte Zecken, aber kei-

ne Krankheitsfälle gab, ist unklar. Der Walliser Kantonsarzt hat aufgrund der Befunde eine eigene Studie in Auftrag gegeben, die bis Ende Juli vorliegen soll.

Ein weisser Fleck auf der Karte bleibt vorläufig das Tessin, wo aus Zeitmangel keine Zecken eingesammelt werden konnten. ■

Blutsauger auf dem Vormarsch

Momentan ist die Gefahr, von Zecken gebissen zu werden, am grössten. Je wärmer die Früh-sommertage, desto aktiver sind die kleinen Blutsauger. In der Region gibt es einige Risiko-gebiete – dazu gehören Jona, Rüti, Mollis und Freienbach.

Sie sind knapp einen Millimeter gross, können für den Menschen ziemlich gefährlich werden und lauern derzeit zu Tausenden an Grashalmen, Büschen und Sträuchern – wie blutrünstige Vampire – auf ihre Opfer. «Mai und Juni sind typische Zeckenmonate, dann gibt es die meisten Bisse», bestätigt der St. Galler Kantonsarzt Markus Betschart.

Experten rechnen aufgrund des langen, harten Winters mit einem Anstieg der Zeckenpopulation. Eine Zunahme wurde aber 2010 im Kanton St. Gallen bislang nicht festgestellt.

Dank der neuen Risikokarte des Bundes weiss man seit kurzem genau, in welchen Gebieten Zecken vorkommen, die für den Menschen ein Gesundheitsrisiko darstellen. Vor Jahresfrist hatten Experten des Bundes an 200 verschiedenen Standorten in der Schweiz die Infektionsrate der Zecken untersucht. In der Region zählen Jona, Wagen, Rüti aber auch Mollis, Ennenda und Freienbach zu den Risikogebieten (siehe Grafik).

Keine neuen Gebiete gefunden

Im Dreieck Jona-Wagen-Rüti wurden insgesamt 1500 Zecken untersucht,

nur gerade eine trug den gefährlichen FSME-Virus in sich. Für den Kantonsarzt brachte die Studie keine Überraschungen. «Just diese Gebiete waren schon auf der alten Gefahrenkarte markiert. Nun sind sie einfach offiziell bestätigt.» Betschart kritisiert jedoch, dass im Kanton zu wenige Gebiete detailliert geprüft worden seien.

Die häufigsten Erkrankungen bei Zeckenstichen sind die bakterielle Infektion Borreliose sowie die Virusinfektion FSME (Frühsommer-Meningoenzephalitis). Weitaus gefährlicher als Borreliose, die mit Antibiotika behandelt werden kann, ist der Biss einer FSME-infizierten Zecke. In rund 15 Prozent der Fälle verursacht er bei Menschen eine Hirnhautentzündung. Die Folgen reichen von Konzentrations-, Sprech- und Gehstörungen bis zu Lähmungserscheinungen oder bleibenden Behinderungen. Etwa jeder 100. Betroffene stirbt an der Krankheit.

Kaum FSME-Fälle im Spital Linth

In der Schweiz erkrankten 2009 rund 4000 Personen an Borreliose durch Zeckenbisse. Jeden dritten Tag kommt es landesweit zu einer FSME-Infektion. «2010 gab es im Kanton St. Gallen erst zwei FSME-Fälle. Im Vorjahr wurden neun, 2008 zehn Fälle registriert», ergänzt Betschart.

Auch das Spital Linth in Uznach behandelt nur selten Patienten mit gefährlichen Zeckenstichen. «Bei 'normalen' Bissen suchen die Betroffenen meist den Hausarzt auf oder lassen sich ambulant behandeln. Dazu gibt

es keine konkreten Zahlen. Im Schnitt haben wir etwa zwei Fälle von Zecken-Hirnhautentzündungen pro Jahr», sagt Alfons Weber, Chefarzt Medizin am Spital Linth.

Die meisten dieser Behandlungen verliefen positiv, nur ganz vereinzelt gebe es bleibende Schäden. Weber erinnert sich lediglich an einen FSME-Erkrankten in den vergangenen Jahren, bei dem das befallene zentrale Nervensystem nicht vollständig geheilt werden konnte.

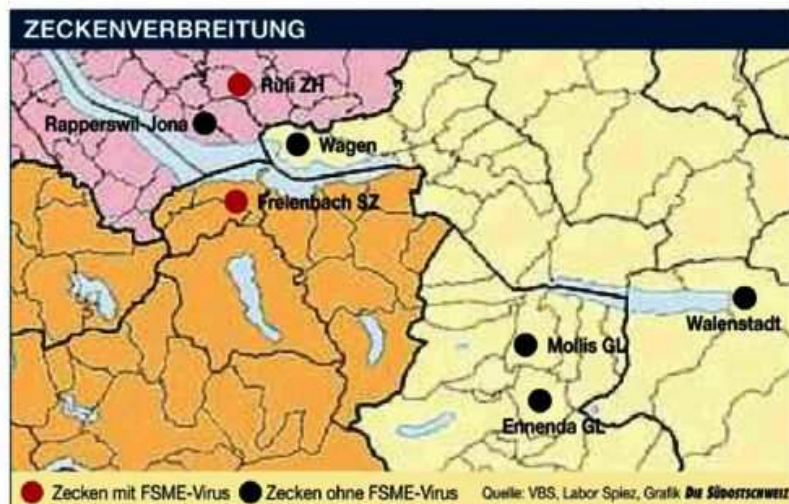
Impffreudige St. Galler Teenager

Trotz der geringen Gefahr, an Zecken-Hirnhautentzündung zu erkranken, empfehlen Kanton und Bundesamt für Gesundheit jenen, die sich viel im Wald oder Grünen aufhalten, eine Impfung.

«Bei FSME-Infektionen gibt es keine spezifische Therapie, nur eine Impfung bietet langanhaltenden Schutz», so Betschart. Gemäss aktuellen Zahlen des Bundes hat sich im Kanton St. Gallen 2009 ein Viertel aller 16-Jährigen der teils umstrittenen Zeckenimpfung unterzogen.

Ein guter Schutz bei Waldspaziergängen ist das Tragen von langen Hosen, geschlossenen Schuhen sowie das Besprühen mit Zeckenschutzmitteln. Nach dem Spaziergang sollen alle Körperstellen genau auf Zeckenstiche kontrolliert werden. (rol)

Informationen über Zecken und Verhaltensregeln bei Zeckenbissen: www.zecke.ch, www.zecken.ch, www.zeck-o-schreck.ch.



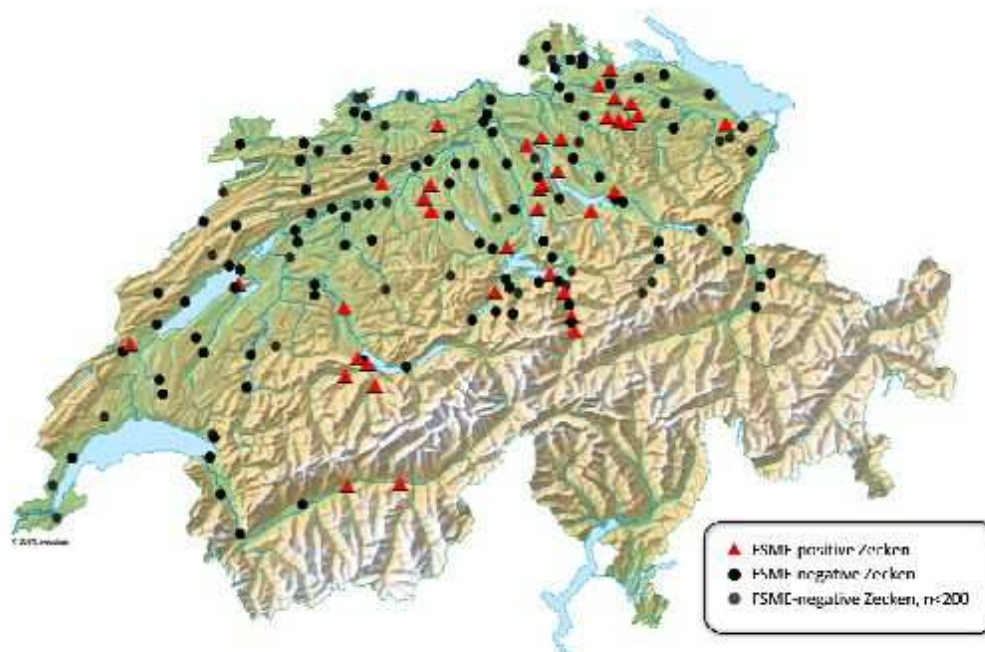
Fact sheet, available for download at the SPIEZ LABORATORY homepage



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Departement für Verteidigung,
Bevölkerungsschutz und Sport VBS
Bundesamt für Bevölkerungsschutz BABS
LABOR SPIEZ

Anhang: Neue Studie zur Verbreitung der Zeckenhirnhaut-Entzündung



Accepted for publication in ADW, ASM, Günter R, Mühlmann K, Strasser M, Beutler CM, 2019

Kanton	Gemeinde	PLZ	Anzahl un- tersuchte Zecken	Anzahl FSME- positive Ze- cken	Geschätzte Prävalenz
 AG	Gränichen	5722	549	0	0 %
 AG	Baden	5405	508	0	0 %
 AG	Würenlingen	5303	446	0	0 %
 AG	Bremgarten	5620	235	0	0 %
 AG	Brugg-Lauffohr	5200	439	0	0 %
 AG	Staffelbach	5053	470	0	0 %
 AG	Egliswil	5070	448	0	0 %
 AG	Auw	5644	476	0	0 %
 AG	Rheinfelden Gde Möhlin	4313	129	0	0 %
 AG	Brittnau	4805	457	5	1.09 %
 AG	Zofingen	4800	455	2	0.44 %
 AG	Döttingen	5312	556	0	0 %
 AG	Gipf-Oberfrick	5073	446	1	0.22 %
 AI	Gonten	9108	0	0	-
 AI	Rüte	9050	0	0	-
 AI	Oberegg	9413	0	0	-
 AR	Gais	9056	25	0	0 %
 AR	Herisau	9100	1	0	0 %
 AR	Speicher	9042	119	0	0 %
 BL	Muttenz	4132	213	0	0 %
 BL	Reinach	4153	512	0	0 %
 BL	Liesberg	4253	344	0	0 %
 BL	Roggenburg	2814	535	0	0 %
 BL	Liestal	4410	179	0	0 %
 BL	Waldenburg	4437	399	0	0 %
 BS	Basel, Lange Erlen	4058	2	0	0 %
 BS	Riehen	4125	8	0	0 %
 BE	Aarberg	3270	119	0	0 %
 BE	Aarwangen	4912	173	0	0 %
 BE	Bern	3027	452	0	0 %
 BE	Köniz	3098	495	0	0 %
 BE	Wynningen	3472	442	0	0 %
 BE	Busswil bei Büren	3292	578	0	0 %
 BE	Saint-Imier	2610	297	0	0 %
 BE	Gampelen	3236	480	0	0 %
 BE	Fraubrunnen	3312	530	0	0 %
 BE	Reichenbach i. K.	3713	384	2	0.52 %
 BE	Unterseen	3800	445	0	0 %
 BE	Moutier	2740	392	0	0 %
 BE	Orpund	2552	589	0	0 %
 BE	Erlenbach i. S.	3762	449	4	0.89 %
 BE	Spiez, Einigenwald	3700	534	0	0 %
 BE	Spiez, Rustwald	3700	462	2	0.43 %
 BE	Belp	3123	467	1	0.21 %
 BE	Thun	3604	332	1	0.30 %
 BE	Wangen an der Aare	3380	523	0	0 %
 BE	Signau	3534	39	0	0 %
 FR	La Tour-de-Trême	1635	493	0	0 %
 FR	Nuvilly	1485	435	0	0 %
 FR	Villeneuve	1527	419	0	0 %

	FR	Rossens	1728	565	0	0 %
	FR	Giffers	1735	48	0	0 %
	GE	Carouge	1227	7	0	0 %
	GE	Versoix	1290	52	0	0 %
	GL	Beglingen Gde Mollis	8753	298	0	0 %
	GL	Ennenda	8755	492	0	0 %
	GL	Linthal	8783	163	0	0 %
	GL	Luchsingen	8775	8	0	0 %
	GR	Fläsch	7306	625	0	0 %
	GR	Zizers	7205	257	0	0 %
	GR	Chur	7000	397	0	0 %
	GR	Seewis im Prättigau	7214	685	0	0 %
	JU	Delsberg	2800	497	0	0 %
	JU	Les Bois	2336	504	0	0 %
	JU	Goumois	2354	35	0	0 %
	JU	Porrentruy	2900	583	0	0 %
	LU	Entlebuch	6162	11	0	0 %
	LU	Hochdorf	6280	120	0	0 %
	LU	Emmen	6030	381	0	0 %
	LU	Ebikon	6032	441	1	0.23 %
	LU	Knutwil	6213	442	0	0 %
	LU	Neuenkirch	6206	404	0	0 %
	LU	Dagmersellen	6252	545	3	0.55 %
	NE	Saint-Aubin-Sauges	2024	318	0	0 %
	NE	Saint-Blaise	2072	650	0	0 %
	NE	Cernier	2053	173	0	0 %
	NE	Couvet	2108	224	0	0 %
	NW	Beckenried	6375	442	0	0 %
	NW	Stans	6370	413	0	0 %
	NW	Stansstad	6362	463	0	0 %
	NW	Wolfenschiessen	6386	79	0	0 %
	OW	Engelberg	6390	274	0	0 %
	OW	Giswil	6074	412	0	0 %
	OW	Alpnach	6055	384	1	0.26 %
	OW	Kerns	6064	394	0	0 %
	SH	Beringen	8222	19	0	0 %
	SH	Dörflingen	8239	324	0	0 %
	SH	Hallau	8215	332	0	0 %
	SH	Neuhausen am Rheinfall	8212	524	0	0 %
	SH	Buchtalen Gde Schaffhausen	8203	447	0	0 %
	SH	Hemmental	8231	344	0	0 %
	SH	Stein am Rhein	8260	526	1	0.19 %
	SZ	Gersau	6442	546	1	0.18 %
	SZ	Freienbach	8807	434	2	0.46 %
	SZ	Arth	6415	243	0	0 %
	SZ	Schwyz	6430	169	0	0 %
	SZ	Riemenstalden	6452	32	0	0 %
	SO	Oensingen	4702	561	3	0.54 %
	SO	Obergösgen	4653	546	0	0 %
	SO	Bellach	4512	189	0	0 %
	SO	Grenchen	2540	588	0	0 %
	SO	Olten	4600	547	0	0 %
	SO	Deitingen	4543	135	0	0 %

	SO	Balsthal	4710	400	0	0 %
	SO	Breitenbach	4226	209	0	0 %
	SO	Biberist	4562	565	0	0 %
	SG	Lüdingen Gde Altstätten	9450	430	0	0 %
	SG	Mörschwil	9402	523	2	0.38 %
	SG	Rorschacherberg	9404	431	0	0 %
	SG	Mels	8887	674	0	0 %
	SG	Walenstadt	8880	663	0	0 %
	SG	Oberbollingen Gde Jona	8645	451	0	0 %
	SG	Wagen Gde Jona	8645	494	0	0 %
	SG	St. Gallen	9011	17	0	0 %
	SG	Alt St. Johann	9656	13	0	0 %
	SG	St. Margrethen	9430	39	0	0 %
	SG	Buchs	9470	559	0	0 %
	SG	Niederhelfenschwil	9527	201	0	0 %
	TG	Uttwil	8592	408	0	0 %
	TG	Diessenhofen	8253	391	0	0 %
	TG	Aadorf	8355	533	1	0.19 %
	TG	Frauenfeld	8500	451	1	0.22 %
	TG	Thundorf	8512	504	1	0.20 %
	TG	Tägerwilen	8274	410	0	0 %
	TG	Lommis	9506	678	3	0.44 %
	TG	Wängi	9545	721	6	0.83 %
	TG	Homburg	9508	550	0	0 %
	TG	Hüttwilen	9536	305	0	0 %
	TG	Bürglen/Weinfelden	8575	393	0	0 %
	TI	Isonne	6810	0	0	-
	TI	Bironico	6804	0	0	-
	TI	Cevio	6675	0	0	-
	UR	Altdorf	6460	423	0	0 %
	UR	Schattdorf	6467	411	2	0.49 %
	UR	Erstfeld	6472	469	0	0 %
	UR	Sisikon	6452	430	2	0.47 %
	UR	Silenen	6473	358	1	0.28 %
	UR	Seelsiberg	6377	389	0	0 %
	VS	Collombey-Muraz	1893	267	0	0 %
	VS	Raron/Turtig	3942	466	1	0.22 %
	VS	Vernayaz	1904	475	0	0 %
	VS	Salgesch	3970	135	1	0.74 %
	VS	Sion	1950	190	0	0 %
	VD	Noville	1845	212	0	0 %
	VD	Cudrefin	1588	500	1	0.20 %
	VD	Echallens	1040	409	0	0 %
	VD	Lausanne	1000	452	0	0 %
	VD	Saint-Livres	1176	173	0	0 %
	VD	Nyon	1260	202	0	0 %
	VD	Brent Gde Montreux	1817	23	0	0 %
	VD	Montreux	1820	354	0	0 %
	VD	Les Clées	1356	337	0	0 %
	VD	Fiez	1420	19	0	0 %
	VD	Rances	1439	555	2	0.36 %
	ZG	Menzingen	6313	10	0	0 %
	ZG	Steinhausen	6312	474	4	0.84 %
	ZG	Walchwil	6318	372	0	0 %
	ZH	Aeugst am Albis	8914	430	2	0.47 %

ZH	Stallikon	8143	207	0	0 %
ZH	Dorf	8458	559	0	0 %
ZH	Rheinau	8462	769	0	0 %
ZH	Oberstammheim	8477	90	1	1.11 %
ZH	Bassersdorf	8303	723	2	0.28 %
ZH	Rümlang	8153	417	1	0.24 %
ZH	Unterengstringen	8103	599	1	0.17 %
ZH	Wetzikon	8620	281	0	0 %
ZH	Rüti ZH	8630	535	1	0.19 %
ZH	Horgen	8810	493	0	0 %
ZH	Langnau am Albis	8135	411	2	0.49 %
ZH	Zollikon	8702	461	2	0.43 %
ZH	Illnau-Effretikon	8308	45	0	0 %
ZH	Greifensee	8606	464	0	0 %
ZH	Elgg	8353	712	1	0.14 %
ZH	Winterthur	8404	228	0	0 %
ZH	Zürich	8045	29	0	0 %

Accepted for publication in AEM, ASM; Gäumann R, Mühlemann K, Strasser M, Beuret CM; 2010

Anmerkung: Bei Stichprobengrössen (Anzahl untersuchte Zecken) kleiner als 200 liegt der Fehler für die Prävalenzschätzung mit einem Vertrauensintervall von 95% bei etwa 1 %. Dies bedeutet, dass die tatsächliche Zeckenbefallsrate an diesen Orten um bis zu 1 % von der geschätzten Befallsrate abweichen kann. Für Stichprobengrösse kleiner als 100 liegt dieser Fehler sogar bei 1.4 %. Schätzungen mit sehr kleinen Stichprobengrössen sollten darum mit Vorsicht behandelt werden.

Declaration of Originality

Last name, first name: Gäumann, Rahel

Matriculation number: 03-108-420

I hereby declare that this thesis represents my original work and that I have used no other sources except as noted by citations.

All data, tables, figures and text citations which have been reproduced from any other source, including the internet, have been explicitly acknowledged as such.

I am aware that in case of non-compliance, the Senate is entitled to divest me of the doctorate degree awarded to me on the basis of the present thesis, in accordance with the "Statut der Universität Bern (Universitätsstatut; UniSt)", Art. 20, of 17 December 1997.

Place, date

Signature

Thun, August 27th, 2010

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and strokes, positioned below the 'Signature' label.