

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Untersuchung der Seroprävalenz von Impf- und  
Infektionsantikörpern gegen die  
Frühsommer-Meningoenzephalitis  
in einem Endemiegebiet in Süddeutschland**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Kathrin Euringer  
aus Mainburg

Leipzig, 2023



Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Martin Pfeffer

Arbeit angefertigt am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr,  
München

Mentor: OFA Prof. Dr. Gerhard Dobler



Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Martin Pfeffer

Gutachter: Prof. Dr. Martin Pfeffer, Institut für Tierhygiene und Öffentliches  
Veterinärwesen, Universität Leipzig, Leipzig

Tag der Verteidigung:

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus .....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Virologie .....	3
2.1.2	Virusreplikation .....	4
2.1.3	Epidemiologie in Deutschland .....	5
2.1.4	Infektion und Krankheitsverlauf .....	10
2.1.5	Impfung .....	11
2.1.6	Diagnostik .....	12
2.1.7	Serologische Methoden .....	13
<b>3</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Eigenanteil Publikation 1 .....</b>	<b>16</b>
3.1.1	Publikation 1 .....	18
<b>3.2</b>	<b>Eigenanteil Publikation 2 .....</b>	<b>27</b>
3.2.1	Publikation 2 .....	28
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>38</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>49</b>
7.1	Literatur .....	49
7.2	Abbildungsverzeichnis .....	58
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>59</b>

## Abkürzungsverzeichnis

C	Capsid protein
CFR	Case fatality rate; fallbezogene Fatalitätsrate
E	Envelope protein
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FSME (-Virus)	Frühsommer-Meningoenzephalitis (-Virus)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IIFT	Indirekter Immunfluoreszenztest
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
Kb	Kilo-Basenpaare
Kda	Kilodalton
M	Membrane protein
Nm	Nanometer
NS1	non structural protein 1 (Nichtstrukturprotein 1)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	pondus hydrogenii, Maß für sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
RC	replication complex, Replikationskomplex

RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SNT	Serumneutralisationstest
STIKO	Ständige Impfkommission am Robert-Koch-Institut, Berlin
TBE (Virus)	Tick-Borne Encephalitis (Virus)
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentralnervensystem



## 1 Einleitung

Die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) ist eine der wichtigsten zeckenübertragenen Infektionskrankheiten Europas und einigen Teilen Asiens mit mehr als 10.000 Erkrankungsfällen pro Jahr (BOGOVIC 2015).

Verursacht wird die FSME durch das FSME-Virus. Das FSME-Virus ist dem Genus *Flavivirus* innerhalb der Familie Flaviviridae zugeordnet. Infizierte Zecken sind die Vektoren für das FSME-Virus und übertragen dieses bei der Blutmahlzeit auf ihren Wirt. In Deutschland sind Zecken der Spezies *Ixodes ricinus* die vorherrschenden Überträger. Die Virusreservoir stellen vor allem kleine Nagetiere, wie Mäuse, dar (DOBLER 2010).

Die Infektion mit dem FSME-Virus kann zu einem biphasischem Krankheitsverlauf führen, sofern die Infektion nicht asymptomatisch verläuft. Der vorangehenden Fieberphase folgt die ZNS-Symptomatik, die sich unter anderem als Meningitis äußern kann (KAISER 2016). Eine FSME kann letal enden; nicht selten bleiben bei den Betroffenen zumindest ernsthafte Folgeschäden zurück. Bei Erkrankung gibt es keine Kausaltherapie, jedoch eine Schutzimpfung, die in den 1980er Jahren in Deutschland eingeführt wurde.

Trotz der potenziellen Gefährlichkeit der Erkrankung liegen wenige Daten zur Seroprävalenz vor. Zum einen wird die Serologie durch die Kreuzreaktivität der IgG-Antikörper durch zunehmend auch in Europa vorkommende Flaviviren, wie beispielsweise dem West-Nil-Virus (WNV) oder dem Usutu-Virus (USUV) oder auch reiseassoziierten Infektionen durch das Gelbfieber-Virus (YFV) oder Japanische-Enzephalitis-Virus (JEV) und die Impfungen gegen diese verkompliziert (ASHRAF et al. 2015; KAMPEN et al. 2020; MANSFIELD et al. 2011). Zum anderen können konventionelle serologische Tests die Antikörper, die infolge der Schutzimpfung gebildet werden, nicht von den Antikörpern unterscheiden, die durch eine vorangegangene FSME-Infektion induziert wurden.

Ziel dieser Arbeit war es mithilfe einer neuen serologischen Methode, die die Unterscheidung von Impf- und Infektionsantikörpern ermöglicht, neue Daten zu FSME-Seroprävalenz- und Infektionsrate, Manifestationsindex sowie serologischer Immunitätsrate in einem FSME-Endemiegebiet in Baden-Württemberg zu erheben. Die aktuell in der Literatur zitierten Zahlen zu diesen epidemiologischen Parametern stammen

## Einleitung

teilweise aus den 60er und 70er Jahren, weswegen eine Neuevaluation von großem Interesse ist.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus

#### 2.1.1 Virologie

Das FSME-Virus ist das medizinisch bedeutsamste Mitglied der FSME-Virus-Serokomplexgruppe aus dem Genus *Flavivirus* der Familie Flaviviridae. Das Genus Flavivirus umfasst über 70 verschiedene Virusspezies (KUNO et al. 1998). Viele davon, zum Beispiel das Gelbfieber-Virus (YFV) oder das Japanische-Enzephalitis-Virus (JEV), sind humanpathogene Erreger (GOULD und SOLOMON 2008). Die Einteilung der Familie der Flaviviren in Serokomplexgruppen erfolgt unter dem Aspekt ihres dominanten Vektors (Mücken, Zecken oder nicht durch Arthropoden übertragen), ihrer daraus resultierenden genomischen Ähnlichkeit und antigenen Eigenschaften (RATHORE und ST. JOHN 2020). Die von Zecken übertragenen Flaviviren werden weiterhin in die bei Säugetieren und die bei Seevögeln vorkommenden Flaviviren unterschieden (DOBLER et al. 2012). Zur FSME-Serokomplexgruppe gehören außerdem unter anderem das Louping-III-Virus (LIV) und das Powassan-Virus (POWV), die ebenfalls Enzephalitiden bei Menschen und Tieren verursachen, sowie das Omsk-Hämorrhagische-Fieber-Virus (OHFV) und das Kyasanur-Wald-Fieber-Virus (KFDV), die Erreger von hämorrhagischem Fieber sind (MANSFIELD et al. 2009). Insgesamt werden drei phylogenetische FSME-Subtypen unterschieden; der Europäische (TBEV-Eu), Sibirische (TBEV-Sib) und Fernöstliche (TBEV-FE) Subtyp (RUZEK et al. 2019a). Außerdem wurden in den letzten Jahren zwei neue Subtypen beschrieben, ein Baikal- (TBEV-Bkl) und ein Himalaya- (TBEV-Him) Subtyp (DAI et al. 2018; KOVALEV und MUKHACHEVA 2017).

Die FSME-Virionen haben einen Durchmesser von ca. 50 nm. Sie sind von einer Lipidmembran umhüllt. Die Oberfläche der Lipidmembran enthält ein Membranprotein (M, 8Kda) und ein glykosyliertes Hüllprotein (E, 53 Kda). Das Kapsidprotein (C, 12 Kda) enthält die einzelsträngige, 11 kb große RNA von positiver Polarität (ss+ RNA). Das Hüllprotein E induziert die Membranfusion mit der Wirtszelle und ist das Hauptziel der Immunantwort bei verschiedenen Wirten (FÜZIK et al. 2018; RUZEK et al. 2019b).

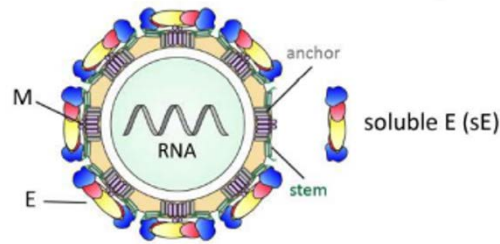


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines reifen FSME-Virion (RUZEK et al. 2019b)

Neben den Strukturproteinen (E, M, C) kodiert das FSME-Virus, wie alle Flaviviren, auch für Nichtstrukturproteine. Das FSME-Virus verfügt über sieben Nichtstrukturproteine (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A und NS4B, NS5), die unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Das NS1-Protein beispielsweise liegt in unterschiedlichen Formen vor; intrazellulär an Membranen gebunden oder gelöst im Zytoplasma. Die intrazelluläre, membran-assoziierte Form ist wichtig für die Replikation der RNA, Translation der Proteine und Produktion von Virionen. Über den Bindungsmechanismus des stark hydrophilen NS1-Proteins an Membranen ist nach wie vor wenig bekannt (RUZEK et al. 2019b). Des Weiteren kann das NS1-Protein extrazellulär in gelöster Form vorliegen. Hier induziert es nicht nur eine humorale Immunantwort des Wirts (ALBINSSON et al. 2019), sondern hilft auch bei der Immunevasion des Virus durch Inhibition des Komplementsystems (AVIRUTNAN et al. 2011; RASTOGI et al. 2016).

### 2.1.2 Virusreplikation

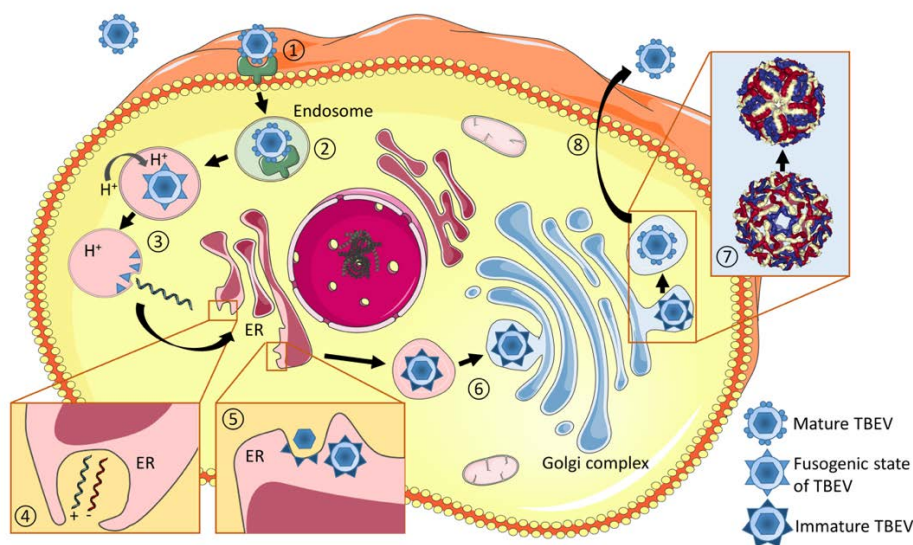


Abbildung 2: Die Replikation des FSME-Virus in der Wirtszelle (RUZEK et al. 2019a)

Die Infektion der Wirtszelle erfolgt mit der Bindung des Virus an einen Zellrezeptor, der aktuell noch nicht genau identifiziert werden konnte. Die Interaktion des Virus mit der Zelle wird dabei vom viralen E-Protein induziert (RUZEK et al. 2019b). Nach der Bindung wird das Viruspartikel via Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen. Durch den geringen pH-Wert im Endosom kommt es durch Änderungen im E-Protein zu einer Verschmelzung des E-Proteins mit der Endosomen-Membran, wodurch es zu einer Freisetzung des Virions ins Zytoplasma der Wirtszelle kommt. Am Endoplasmatischen Reticulum (ER) wird die RNA des Virus schließlich repliziert. Hierbei kommt dem intrazellulären NS1-Protein eine zentrale Rolle zu: Zusammen mit anderen Nichtstrukturproteinen und der viralen RNA formt es einen Replikationskomplex (RC) an der luminalen Seite des ER. Außerdem unterstützt das intrazelluläre NS1-Protein durch die Interaktion mit verschiedenen Wirtspoteinen die virale Replikation, Translation und RNA-Produktion. Die unreifen Virionen erlangen ihre Lipidhülle durch das sogenannte Budding am Endoplasmatischen Reticulum. Die Reifung der Virionen erfolgt am Golgi Komplex (RUZEK et al. 2019a). Die reifen Viruspartikel werden in Vesikeln zur Wirtszellmembran transportiert und mittels Exozytose ausgeschleust (RUZEK et al. 2019b).

### 2.1.3 Epidemiologie in Deutschland

Die klinische Erstbeschreibung der FSME erfolgte im Jahr 1931 durch den österreichischen Internisten Hans Schneider (SCHNEIDER 1931).

In Deutschland wurde der erste Nachweis des FSME-Virus von Sinnecker und seiner Forschungsgruppe erbracht (SINNECKER 1960). In den frühen 60er Jahren wurde, ebenfalls von Sinnecker und seiner Arbeitsgruppe, das erste FSME-Virus aus *Ixodes ricinus* Zecken aus Naturherdgebieten der ehemaligen DDR isoliert (APITZSCH et al. 1968).

In den 70er Jahren wurde in Österreich der erste Impfstoff zugelassen (LEHRER und HOLBROOK 2011). In Deutschland wurde die FSME-Impfung ab 1982 vorerst bestimmten Risikogruppen, wie Waldarbeitern, empfohlen (RKI 2018).

Für die FSME wurde im Jahr 2012 vom European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) die erste einheitliche Falldefinition veröffentlicht und auf die Liste der meldepflichtigen Krankheiten gesetzt (ECDC 2012b; ECDC 2012a). Die Falldefinition

des ECDC schließt nur Fälle ein, in denen neurologische Symptome in Kombination mit einem labordiagnostischen Nachweis auftreten. Die vom RKI bereitgestellte deutsche Falldefinition unterscheidet sich von der des ECDC, denn sie schließt auch Krankheitsverläufe ein, die „nur“ allgemeine Krankheitszeichen wie Fieber, ohne neurologische Symptome, zeigen. Der labordiagnostische Nachweis umfasst hierbei den direkten Erregernachweis mittels PCR oder einen serologischen Antikörpernachweis aus Serum oder Liquor des Patienten (RKI 2019).

Die Bewertung von Risikogebieten ist Inzidenz-basiert. Ein Landkreis wird dann als FSME-Risikogebiet ausgewiesen, wenn in einem Fünfjahresintervall die Inzidenz von einem Fall pro 100.000 Einwohnern pro Jahr signifikant überschritten wird (RKI 2022b). Ein Kreis behält mindestens 20 Jahre lang seinen Status als Risikogebiet (RKI 2013).

Die gemeldeten FSME-Fälle in Deutschland sind auf der Internetseite des RKI öffentlich einsehbar (RKI 2022a) und schwankten seit 2001 zwischen 195 (2012) und 712 (2020) Fällen pro Jahr (RKI 2022b).

FSME-Risikogebiete sind vor allem in Süddeutschland zu finden. Die Durchimpfungsrate innerhalb der Risikogebiete (bundeslandbezogen) für Deutschland liegt bei etwa 20-30% (RKI 2022b). Vor Aufkommen eines Impfstoffs in Deutschland wurden für die FSME-Seroprävalenz gebietsabhängig Zahlen von 0,5-25% ermittelt (ACKERMANN et al. 1986; SCHEID et al. 1966).

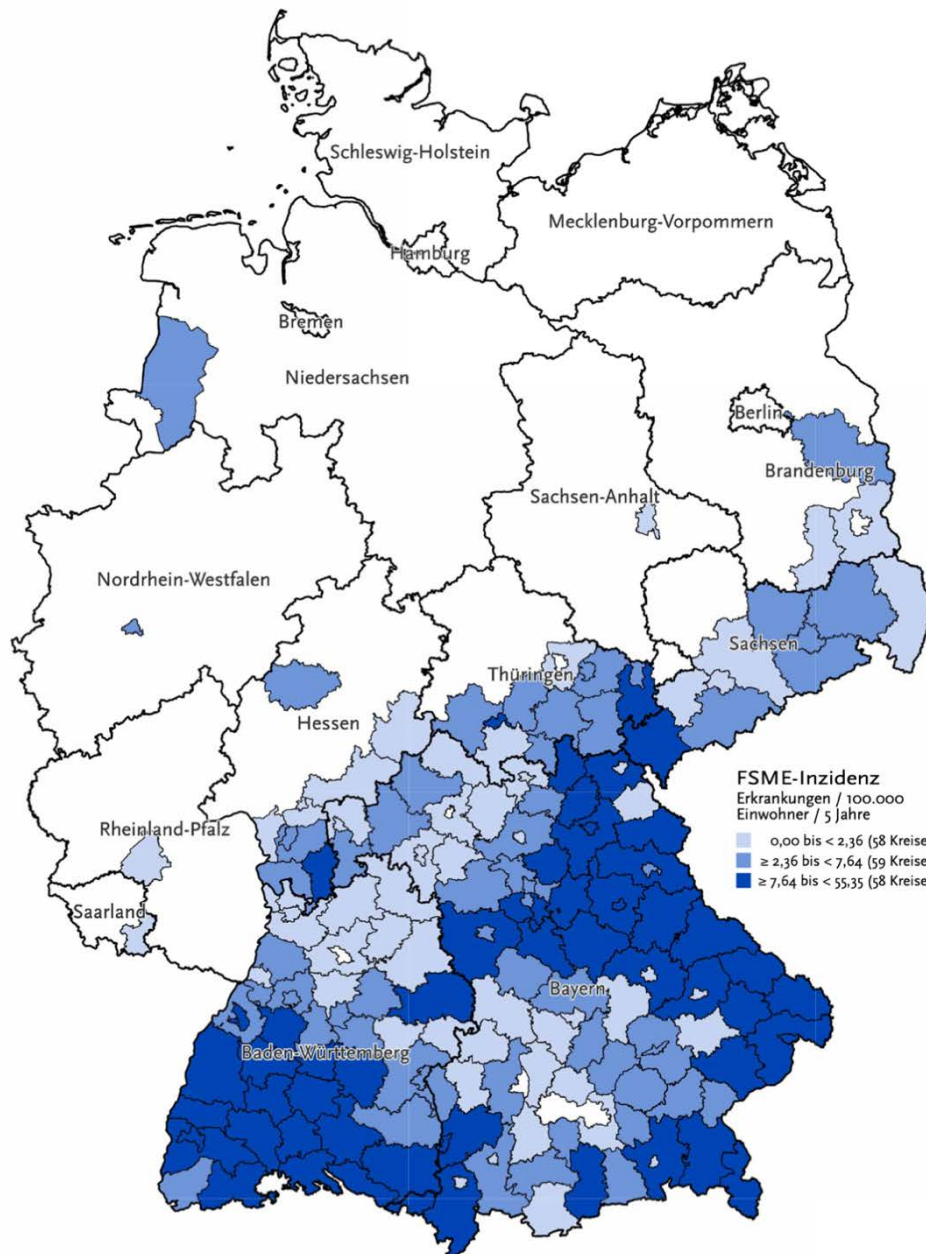


Abbildung 3: FSME-Risikogebiete 2022 in Deutschland (insgesamt 175), gefärbt nach Höhe der Inzidenz im Zeitraum von 2017-2021 (RKI 2022b). Die Häufung der Risikogebiete in Süddeutschland wird deutlich.

### 2.1.3 Übertragungszyklus des FSME-Virus

Innerhalb eines Endemiegebiets konzentriert sich das Vorkommen von mit dem FSME-Virus infizierten Zecken auf sogenannte Foci (LITVIN und KORENBERG 1999). In Foci in Baden-Württemberg und Bayern wurden in unterschiedlichen Studien FSME-Prävalenzraten von bis zu 4,8% für die *Ixodes ricinus*-Population ermittelt (OEHME et al. 2002; SÜSS et al. 2002; SÜSS et al. 1999).

Jedes aktive Entwicklungsstadium der Zecke (Larve, Nymphe, Adulte) kann mit dem FSME-Virus infiziert sein (WALDENSTRÖM et al. 2007). In Zentraleuropa ist *Ixodes ricinus* der wichtigste Überträger der FSME. Kleine Nager und Vögel stellen die Reservoirtiere dar und spielen eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung des Übertragungszyklus des FSME-Virus in der Natur (DOBLER 2010; SÜSS 2011). Zecken infizieren sich mit dem FSME-Virus, wenn sie eine Blutmahlzeit an einem virämischen Reservoirwirt zu sich nehmen. Ein weiterer wichtiger Weg der Transmission des FSME-Virus ist das sogenannte Co-Feeding. Dabei teilen sich infizierte und nicht-infizierte Zecken aller Entwicklungsstadien einen nicht-virämischen Wirt, wodurch sich die nicht-infizierten Zecken mit dem FSME-Virus anstecken. Diese Art der Transmission findet mithilfe infizierter Leukozyten statt, die zwischen den mit geringem Abstand voneinander saugenden Zecken migrieren. In diesem Fall fungieren die Zecken als Reservoir und Vektoren gleichermaßen (LABUDA et al. 1997; RANDOLPH 2011).

Das FSME-Virus zirkuliert in einem „parasitären Dreieck“ zwischen dem Virus, den Vektoren, und den Wirten. Innerhalb dieses Dreiecks kann das Virus in einem Habitat über lange Zeit persistieren (SÜSS 2011). Der Mensch ist nicht Teil dieses natürlichen enzootischen Zyklus und daher ein Fehlwirt (DOBLER 2010). Die Zecken lassen sich von den Wirten von der Vegetation abstreifen (CHITIMIA-DOBLER et al. 2019). Das Virus infiziert die Speicheldrüsen der Zecke und wird mit dem Speichel zu Beginn des Stichs in den Wirt abgegeben (DOBLER 2020).



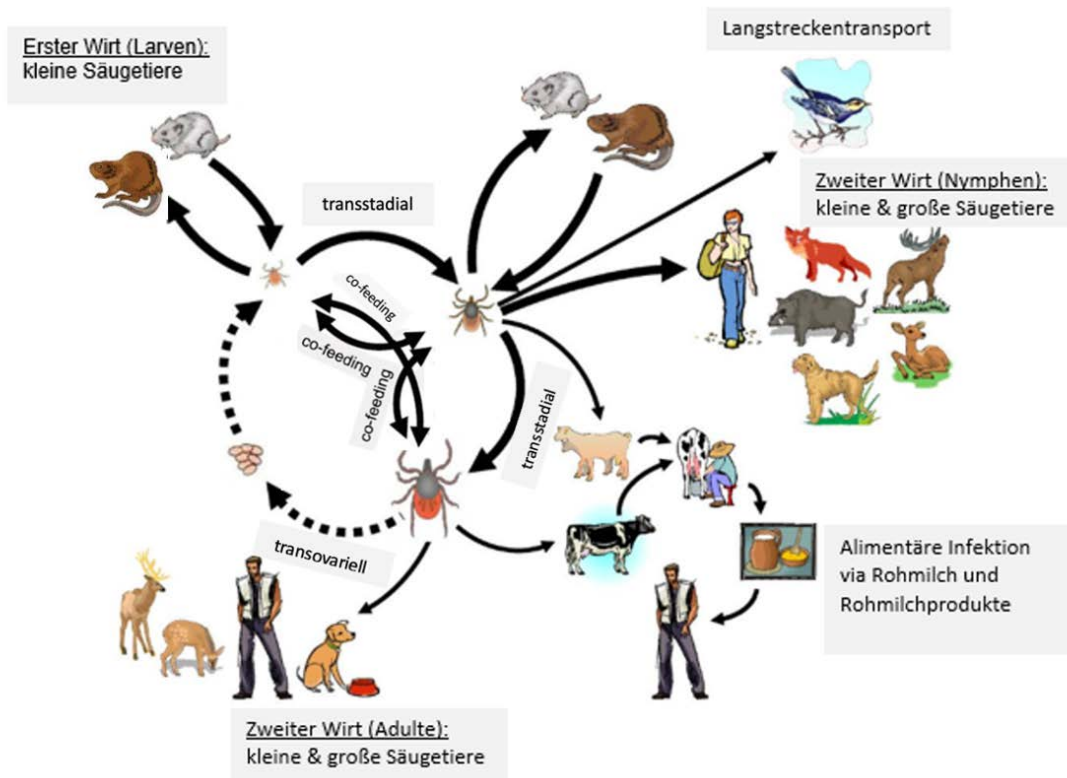


Abbildung 4: Übertragungszyklus des FSME-Virus modifiziert nach PFEFFER und DOBLER (2011)

### 2.1.4 Infektion und Krankheitsverlauf

Die Infektion mit dem FSME-Virus erfolgt in den meisten Fällen durch den Stich einer infizierten Zecke. Der Zeckenspeichel besitzt betäubende und entzündungshemmende Eigenschaften, sodass der Wirt den Stich der Zecke nicht spürt (ŠTIBRÁNIOVÁ et al. 2013). Im Wirt repliziert das Virus zunächst subkutan. Die dendritischen Zellen der Haut, die Langerhans-Zellen, binden das Virus und verursachen eine Immunantwort unter der Ausschüttung von Zytokinen. Im weiteren Verlauf repliziert das Virus in den Lymphknoten und im lymphatischen System, wodurch eine Virämie induziert wird (BORDE und ZAJKOWSKA 2019).

Des Weiteren kann eine Übertragung des FSME-Virus durch den Verzehr von Rohmilchprodukten, insbesondere von Ziegenmilch, erfolgen (BROCKMANN et al. 2018; LIČKOVÁ et al. 2021). Dieser Übertragungsweg weist einen Symptom-Manifestationsindex von fast 100% auf (DOBLER 2020).

Nach einer Inkubationszeit von etwa 5-28 Tagen nach dem Stich der Zecke kommt es bei etwa 2-30% der Patienten zu einer klinischen Manifestation (GUSTAFSON et al. 1992; KAISER 2008). Der Krankheitsverlauf wird in zwei Phasen unterteilt (SMORODINTSEV und DUBOV A.V. 1986). Die primäre, virämische Phase dauert ca. 2-8 Tage und äußert sich in FSME-unspezifischen Symptomen wie erhöhter Temperatur, Kopfschmerzen, Abgeschlagenheit, Myalgien und Gliederschmerzen (VALARCHER et al. 2015). Danach folgt eine Phase, in der keine klinischen Symptome vorliegen. Während 30-50% der symptomatischen Patienten nur die primäre Krankheitsphase durchlaufen (BORDE und ZAJKOWSKA 2019), kommt es bei den restlichen Patienten im Anschluss an die erste Phase zu einer zweiten Krankheitsphase (BOGOVIC et al. 2022; KAISER 1999). In einer Studie von KAISER (1999) wurde bei etwa 75% klinisch erkrankter Personen ein biphasischer Krankheitsverlauf beobachtet. Diese sekundäre Phase ist durch das plötzliche Auftreten von Fieber gekennzeichnet. Während dieser Phase infiziert das Virus das ZNS und verursacht neurologische Symptome wie Anorexie, Kopfschmerzen, Erbrechen, Lichtempfindlichkeit, Paresen, Paralysen oder sogar Koma (VALARCHER et al. 2015). Die fallbezogene Fatalitätsrate (Case Fatality Rate, CFR), die die Sterblichkeitsrate der erkrankten Personen beschreibt, beträgt für eine Infektion mit dem europäischen Subtyp etwa 1% (BOGOVIC 2015; KAISER 1996). Die Todesfälle durch die FSME-Virus Infektion treten innerhalb von 5-10 Tagen nach Beginn der

neurologischen Symptome auf (BORDE und ZAJKOWSKA 2019). Außerdem kommt es in einigen Fällen zu bleibenden Schäden infolge der Infektion des ZNS (KAISER et al. 1997). Diese können sich unter anderem als Ataxien und Paresen der Extremitäten oder Kranielnerven äußern (KAISER 1999).

### 2.1.5 Impfung

Es gibt keine kausale Therapie, sodass die klinisch manifeste FSME symptomatisch behandelt werden muss (RICCARDI et al. 2019). Jedoch gibt es eine sehr wirksame Schutzimpfung gegen das FSME-Virus (NYGREN et al. 2022; TABA et al. 2017). Die verfügbaren Impfungen beinhalten in Zellkulturen produziertes und in Formalin inaktiviertes FSME-Virus. Aktuell in Deutschland zugelassen sind zum einen der Impfstoff FSME-IMMUN® (Pfizer), zum anderen der Impfstoff Encepur® (GalaxoSmithKline) (TABA et al. 2017). Die STIKO (Ständige Impfkommission am Robert-Koch-Institut, Berlin) empfiehlt eine FSME-Immunisierung für Personen, die in FSME-Risikogebieten wohnen, arbeiten oder sich anderweitig dort aufhalten und dabei einem Risiko für Zeckenstiche ausgesetzt sind. Auch beruflich exponierten Personen wird eine Impfung empfohlen (Waldarbeiter, Laborpersonal) (RKI 2022b). Um einen vollständigen Impfschutz zu erhalten, bedarf es dreier Impfdosen (Grundimmunisierung). Die erste Auffrischungsimpfung erfolgt nach drei Jahren. Weitere Auffrischungsimpfungen werden alters- und impfstoffabhängig nach jeweils drei bzw. fünf Jahren verabreicht (RKI 2022b).

Die Wirksamkeit der FSME-Schutzimpfung wurde in Studien nachgewiesen (VENE et al. 2007) und zeigt sich auch in den Fallzahlen. Die Verfügbarkeit des Impfstoffs seit 1976 spielte eine große Rolle im Zurückdrängen der Krankheit, wie am Beispiel Österreichs deutlich wird. Dort sank die FSME-Inzidenz nach großflächiger Durchimpfung der Bevölkerung auf ca. 16% der Inzidenz, die vor Durchimpfung ermittelt wurde (HEINZ et al. 2013).

Die Durchimpfungsrate der Bevölkerung Baden-Württembergs wird mit etwa 18,0% angegeben (RKI 2022b). Diese auf Abrechnungsdaten der Krankenversicherungen basierende Zahl von 2019 ist auffallend niedrig und zeigt, dass in Deutschland selbst im FSME-risikoreichen Baden-Württemberg nur etwa jede 5. Person einen vollständigen und aktuellen Schutz gegen FSME aufweist.

### 2.1.6 Diagnostik

Da die Symptomatik bei einer FSME-Erkrankung nicht FSME-spezifisch ist, ist neben der Aufnahme der Anamnese des Patienten, vor allem im Hinblick auf einen möglichen Zeckenstich oder den Verzehr von Rohmilchprodukten, eine labordiagnostische Bestätigung notwendig (HOLZMANN 2003). Hier gibt es prinzipiell mehrere Möglichkeiten. Während der virämischen Phase, die im initialen Krankheitsstadium auftritt, kann das Blut oder der Liquor des Patienten mithilfe einer RT-PCR (Reverse Transkriptase polymerase-chain-reaction) auf die RNA des Virus untersucht werden. Da die Vorstellung beim Arzt oder im Krankenhaus in der Regel erst ab dem Auftreten neurologischer Symptome erfolgt, das heißt in einem Krankheitsstadium, in dem bereits kein Virus mehr in Blut und Liquor vorhanden ist, erfolgt die FSME-Bestätigung im Labor in der Regel mit serologischen Methoden (HOLZMANN 2003). Nach der Inkubationszeit sowie der akuten Fieberphase der Krankheit wird etwa ab der zweiten Woche post infectionem ein steiler Anstieg des IgM Antikörpertiters im Blut beobachtet. Gleichzeitig steigt, wenn auch langsamer, der IgG-Antikörpertiter an. Dieser bleibt über Jahre bestehen, während die IgM-Antikörper bereits nach etwa sechs Wochen nicht mehr im Blut vorhanden sind (DOBLER 2019; HOLZMANN 2003).

Gemäß des steilen Anstiegs der IgM- und IgG-Antikörper im Blut in der zweiten Phase der Krankheit können bei den meisten Patienten, die durch eine FSME-Infektion an neurologischen Symptomen leiden, in dieser Phase der Krankheit IgM- und IgG-Antikörper im Blut nachgewiesen werden. Werden nur IgM-Antikörper in der Serumprobe nachgewiesen, so muss dies durch eine zweite Probe bestätigt werden. Üblicherweise wird der ELISA für die serologische FSME-Diagnostik verwendet (HOFMANN et al. 1983).

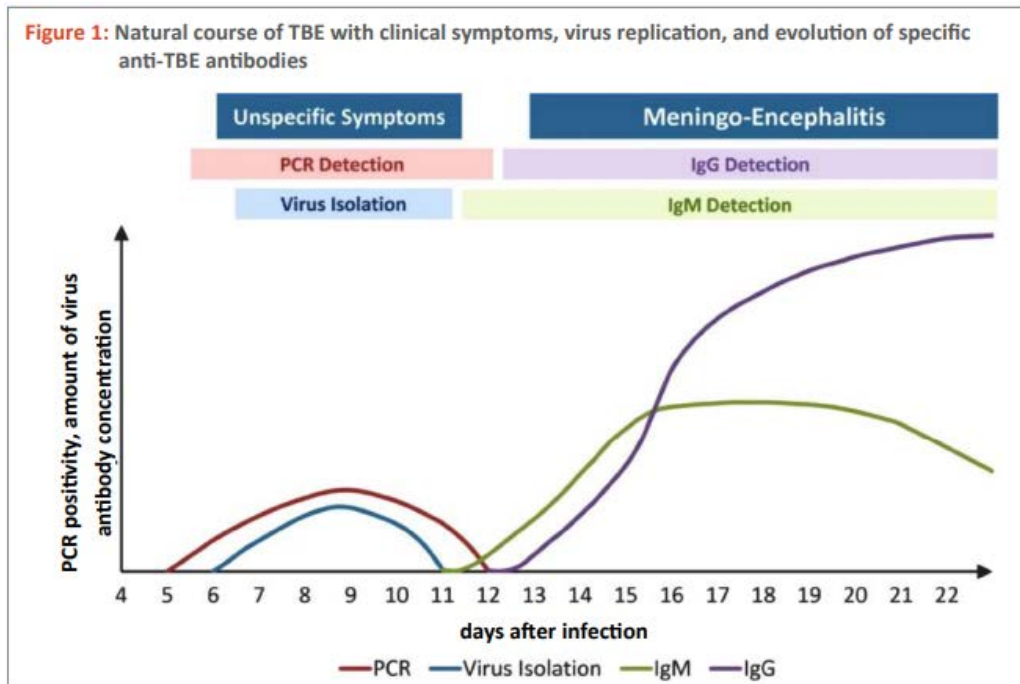


Abbildung 5: Klinischer Verlauf der FSME und Antikörperentwicklung nach DOBLER (2019)

### 2.1.7 Serologische Methoden

Ein Virusnachweis im Blut oder Liquor ist mittels RT-PCR nur in der initialen virämischen Krankheitsphase möglich. Deshalb erfolgt die FSME-Labordiagnostik in der Regel mithilfe von serologischen Methoden. Mögliche Tests sind der Serum-Neutralisationstest (SNT), der indirekte Immun-Fluoreszenztest (IIFT) und der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) (LITZBA et al. 2014).

Der Serum-Neutralisationstest (SNT) basiert auf der Fähigkeit der Antikörper, das Virus zu neutralisieren (HEINZ et al. 1969). Dabei gibt es verschiedene Durchführungsmöglichkeiten. In dem in unserer Studie verwendeten Format, das an ein standardisiertes Protokoll angelehnt ist (OIE 2012), wird bei gleichbleibender Virusmenge eine Titrationsreihe der Patientenprobe angelegt. Dadurch kann der Titer der neutralisierenden Antikörper für das jeweilige Plasma oder Serum bestimmt werden. Für unser Verfahren gilt, dass ein Titer von 1:10 oder größer auf einen immunologischen Schutz gegen das FSME-Virus hinweist, wobei Proben mit einem Titer von 1:10 zum Ausschluss von Kreuzreaktionen im IIFT getestet wurden. Der SNT gibt somit Auskunft über die Qualität der Antikörper in der Patientenprobe und ist beispielsweise indiziert, wenn eine Aussage über den Antikörperschutz des Patienten getroffen werden soll (z.B. nach einer Impfung). Einen weiteren Vorteil des Verfahrens stellt dabei die hohe

Spezifität der neutralisierenden Antikörper für das jeweilige Flavivirus dar: So sind die neutralisierenden Antikörper kaum kreuzreaktiv gegen andere Flaviviren (CHAN et al. 2022; DOBLER 2019)

Der indirekte Immun-Fluoreszenztest (IIFT) setzt mit dem Virus infizierte Zellen voraus (SONNENBERG et al. 2004). Ähnlich dem Prinzip des indirekten ELISAs werden hier an das Virus gebundene Antikörper mit einem fluoreszierenden Marker sichtbar gemacht und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgelesen. Der IIFT gilt als sensitiv für die FSME-Serologie, jedoch kommt es, gerade bei einer vorangegangenen Impfung oder Infektion des Probanden mit anderen Flaviviren, zu Kreuzreaktionen (DOBLER 2019). In unserer Studie wurde der IIFT daher ergänzend eingesetzt, um die Proben auf Kreuzreaktionen mit anderen Flaviviren zu prüfen. Auch hier galt ein Titer von 1:10 als hinweisend auf eine vorangegangene Infektion oder Impfung.

Heutzutage wird für die serologische FSME-Diagnostik üblicherweise das ELISA-Format verwendet (HOFMANN et al. 1983; ROGGENDORF et al. 1981). Dies ist neben seiner relativ einfachen Handhabung auch der Möglichkeit geschuldet, das Verfahren zu automatisieren (DOBLER 2019) und somit große Probenmengen zeitgleich zu testen. Der ELISA ist ein quantitativer Nachweis für Antikörper im Blut des Patienten (LIN 2015). Der indirekte ELISA basiert in der Regel auf Lysaten ganzer Zellen oder aufgereinigten Extrakten, die von solchen Lysaten stammen (LITZBA et al. 2014). Die an das Antigen gebundenen Antikörper der Patientenproben werden mittels eines Detektor-Antikörpers markiert, der an ein Enzym gebunden ist. Dieses Enzym setzt am Ende das zugegebene Substrat um. Die Intensität dieses Farbumschlags wird photometrisch ausgemessen und zeigt an, welche Probe in welchem Umfang Antikörper gegen das FSME-Virus aufweist (LIN 2015).

Die Antikörper, die gegen Flaviviren im Allgemeinen gebildet werden, sind aufgrund der gemeinsamen kreuzreaktiven Epitope auf dem flaviviralen Hüllprotein (E-Protein) meist gegen mehrere Flaviviren kreuzreaktiv und daher in serologischen Tests oft nicht einem Flavivirus eindeutig zuordenbar (CRILL und CHANG 2004; STIASNY et al. 2006). Dabei spielen auch Kreuzreaktivitäten von Impfantikörpern gegen beispielsweise die Gelbfieber- oder die Japanische-Enzephalitis-Impfung eine Rolle (MANSFIELD et al. 2011; SOUZA et al. 2019). Außerdem können kommerzielle ELISAs Impf- von Infektionsantikörpern nicht unterscheiden, da bei einer Impfung, wie auch bei einer

Infektion, Antikörper gegen das E-Protein gebildet werden. Studien zur Seroprävalenz von infektionsinduzierten Antikörpern waren deswegen mit zunehmender Durchimpfung der Bevölkerung in Deutschland nicht mehr möglich. Mit einem auf dem Nichtstrukturprotein 1 (NS1) basierenden ELISA, der im Jahr 2020 entwickelt wurde (GIRL et al. 2020), wurde eine Seroprävalenzstudie im endemischen Landkreis Ortenaukreis in Baden-Württemberg durchgeführt. Da die Nichtstrukturproteine für das jeweilige Flavivirus sehr spezifisch sind (BALMASEDA et al. 2018; BALMASEDA et al. 2017; STEINHAGEN et al. 2016), verspricht dieser ELISA eine höhere Spezifität als auf dem E-Protein basierende ELISAs. Außerdem kann dieser NS1-ELISA Impf- von Infektionsantikörpern unterscheiden, da das NS1-Protein nach bisherigem Forschungsstand nur bei Infektion gebildet und ins Blut abgegeben wird. Nach dieser Auffassung liegen auch nur bei Individuen, die eine FSME-Infektion durchlaufen haben, Antikörper gegen das NS1-Protein vor (ALBINSSON et al. 2018).

### 3 Publikationen

#### 3.1 Eigenanteil Publikation 1

Tick-borne encephalitis virus IgG antibody surveillance: vaccination- and infection-induced seroprevalences, south-western Germany, 2021

Euringer K.<sup>1,6</sup>, Gisl P.<sup>1,8</sup>, Kaier K.<sup>2</sup>, Peilstöcker J.<sup>3</sup>, Schmidt M.<sup>3</sup>, Müller-Steinhardt M.<sup>4</sup>, Rauscher B.<sup>5</sup>, Bressau E.<sup>5</sup>, Kern W.V.<sup>6</sup>, Dobler G.<sup>1</sup> and Borde J.P.<sup>6,7</sup>

<sup>1</sup> Bundeswehr Institute for Microbiology, National TBEV Consultant Laboratory, Neuherbergstrasse 11, 80937 München, Germany

<sup>2</sup> Institute of Medical Biometry and Statistics (IMBI), University Medical Centre Freiburg, Faculty of Medicine, University of Freiburg, Ernst-Zermelo-Straße 1, 79104 Freiburg i.Br., Germany

<sup>3</sup> DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH, Sandhofstraße 1, 60528 Frankfurt a.M., Germany

<sup>4</sup> Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Baden-Baden, DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH, Gunzenbachstraße 35, 76530 Baden-Baden, Germany

<sup>5</sup> Gesundheitsamt des Ortenaukreises, Leutkirchstraße 34b, 77723 Gengenbach, Germany

<sup>6</sup> Division of Infectious Diseases, Department of Medicine II, University Medical Centre Freiburg, Faculty of Medicine, University of Freiburg, Hugstetter Straße 55, 79106 Freiburg i.Br., Germany

<sup>7</sup> Praxis Prof. Borde & Kollegen, Am Marktplatz 8, 77704 Oberkirch, Germany

<sup>8</sup> German Centre for Infection Research (DZIF), partner site Munich, Germany

Eurosurveillance 2023; 28(12): 2200408

Impact Factor: 21,286 (2021)

Eingereicht: 15.05.2022

Akzeptiert: 08.11.2022

Veröffentlicht: 23.03.23



## Publikationen

Stellungnahme zum Eigenanteil der Publikation:

Die Idee zur Untersuchung der Seroprävalenz im Ortenaukreis entwickelten GD und JPB. Die Beschaffung der Proben erfolgte durch MS und MMS. Die Koordination zur Lieferung der Proben erfolgte durch MS, GD, JPB, JP und mich. Die Bearbeitung der Proben führte ich eigenständig durch. Die Literaturrecherche führte ich eigenständig durch, wobei GD und JPB mich berieten. Die epidemiologischen Daten zur FSME im Ortenaukreis lieferten BR und EB. Bei der Auswertung der Daten erhielt ich Hilfe von GD und JPB. Die Erstellung des Manuskripts führte ich eigenständig durch. Bei der Revision des Manuskripts halfen JPB, GD und PG. Die endgültige Version des Manuskripts wurde mithilfe aller Koautoren erstellt.

## 3.1.1 Publikation 1

## RESEARCH

# Tick-borne encephalitis virus IgG antibody surveillance: vaccination- and infection-induced seroprevalences, south-western Germany, 2021

Kathrin Euringer<sup>1,6</sup>, Philipp Girtl<sup>1,8</sup>, Klaus Kaier<sup>2</sup>, Jan Peilstöcker<sup>3</sup>, Michael Schmidt<sup>3</sup>, Michael Müller-Steinhardt<sup>4</sup>, Beate Rauscher<sup>5</sup>, Evelyn Bressau<sup>5</sup>, Winfried V Kern<sup>6</sup>, Gerhard Dobler<sup>1</sup>, Johannes P Borde<sup>6,7</sup>

1. Bundeswehr Institute for Microbiology, National TBEV Consultant Laboratory, Munich, Germany

2. Institute of Medical Biometry and Statistics (IMBI), University Medical Centre Freiburg, Faculty of Medicine, University of Freiburg, Freiburg i.Br., Germany

3. DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH, Frankfurt a.M., Germany

4. Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Baden-Baden, DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH, Baden-Baden, Germany

5. Gesundheitsamt des Ortenaukreises, Gengenbach, Germany

6. Division of Infectious Diseases, Department of Medicine II, University Medical Centre Freiburg, Faculty of Medicine, University of Freiburg, Freiburg i.Br., Germany

7. Praxis Prof. Borde & Kollegen, Oberkirch, Germany

8. German Centre for Infection Research (DZIF), partner site Munich, Munich, Germany

**Correspondence:** Johannes P. Borde (johannes.borde@web.de)

## Citation style for this article:

Euringer Kathrin, Girtl Philipp, Kaier Klaus, Peilstöcker Jan, Schmidt Michael, Müller-Steinhardt Michael, Rauscher Beate, Bressau Evelyn, Kern Winfried V, Dobler Gerhard, Borde Johannes P. Tick-borne encephalitis virus IgG antibody surveillance: vaccination- and infection-induced seroprevalences, south-western Germany, 2021. Euro Surveill. 2023;28(12):pii=2200408. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.12.2200408>

Article submitted on 15 May 2022 / accepted on 08 Nov 2022 / published on 23 Mar 2022

**Background:** The exact epidemiology of tick-borne encephalitis virus (TBEV) infections is unknown because many TBEV infections have an influenza-like or asymptomatic course. Surveillance data are based on patients with any (predominantly neurological) symptoms that prompted diagnostic testing. Infection- and vaccine-induced antibodies against TBEV can be distinguished using an NS1 IgG ELISA. **Aim:** In a seroprevalence study we aimed to investigate TBEV antibody prevalence, incidences, manifestation indices and potential protection rates in a highly endemic district in south-western Germany. **Methods:** We analysed 2,220 samples from healthy blood donors collected between May and September 2021. The reported number of TBEV infections was provided on a sub-district level by the local public health authorities. Blood samples were first screened using a TBEV IgG ELISA. In a second step, all positive samples were further analysed with a recently established NS1 IgG ELISA. The presence of specific antibodies against TBEV (excluding cross-reacting antibodies against other flaviviruses) was confirmed by testing screening-positive samples with a microneutralisation assay. **Results:** Of 2,220 included samples, 1,257 (57%) tested positive by TBEV IgG ELISA and 125 tested positive for infection-induced TBEV NS1 antibodies, resulting in a TBEV NS1 IgG seroprevalence at 5.6% in our population. The yearly incidence based on the NS1 ELISA findings resulted in 283 cases per 100,000 inhabitants. **Conclusion:** Using the TBEV NS1 IgG assay, we confirmed a manifestation index of ca 2% and a high incidence of predominantly silent TBEV infections

(>250/100,000/year), which exceeds the incidence of notified cases (4.7/100,000/year) considerably.

## Introduction

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is the most important tick-borne flavivirus on the Eurasian continent with 10,000–12,000 reported human cases per year [1]. There are three confirmed genetic subtypes, comprising the Far Eastern, European and Siberian subtype and at least two other subtypes (Baikalian, Himalayan) have recently been proposed, based on phylogenetic studies [2]. In central Europe, the only TBEV subtype detected to date is the European subtype [3]. Tick-borne encephalitis virus has been detected from Japan to France and the British Isles and is expanding its range more northern regions of Russia, Sweden and Finland [4]. Humans are only accidental hosts and get infected mainly by tick bite and rarely by alimentary infection with untreated milk or milk products from infected ungulates [2,3]. The occurrence of TBEV is closely associated with the presence of ticks. In Europe, *Ixodes ricinus* is the main vector of TBEV, whereas in the Far East and in Asia, *Ixodes persulcatus* is predominant [1].

In Germany, tick-borne encephalitis (TBE) became a notifiable disease in 2001. More than 7,600 TBE cases were notified between 2001 and 2021 (Robert Koch Institute, [Survstat@rki](mailto:Survstat@rki) [5]). TBE is a vaccine-preventable disease and national vaccination recommendations are issued by the Standing Committee on Vaccination (STIKO) at the RKI, where it is recommended to vaccinate against TBE all people who live or stay in a defined TBE risk area in Germany or in known foreign endemic

areas and may have activities in nature [5]. Of note, the national public health authorities issued a general TBEV vaccination recommendation more than 20 years ago for southern Germany, notably the federal states of Bavaria and Baden-Wuerttemberg [6].

Manifestation of TBEV infection ranges from a sub-clinical course to clinically overt disease, with a variety of symptoms from febrile illness to severe neurological and even life-threatening or fatal central nervous system (CNS) symptoms [7]. According to current understanding of the disease, the ratio of clinical to subclinical forms and the proportion of patients with CNS symptoms are small. Epidemiological studies, dating back to the 1960s, indicate that ca 30% of TBEV infections manifest with unspecific influenza-like symptoms and about 10% of TBEV-infected develop CNS symptoms. These results are linked to a seroprevalence study in the area of Neunkirchen, Lower Austria, a highly endemic region at that time [8]. The authors correlated the seroprevalence in the population with the number of human cases diagnosed at a local hospital and calculated a manifestation index of 8.2% for CNS symptoms. Confirmatory studies have been hampered since the introduction of TBEV vaccines which have made it impossible to differentiate between vaccine-induced and infection-induced antibodies against TBEV infection. In addition, the emergence in central Europe of cross-reacting flaviviruses such as West Nile virus (WNV), Usutu virus (USUV), dengue virus (DENV), Zika virus (ZIKV), and travel-associated vaccinations against yellow fever virus (YFV) or Japanese encephalitis virus (JEV), may complicate sero-epidemiological surveys. Epidemiological studies conducted before the introduction of TBEV vaccines showed antibody prevalence in Germany ranging from 0.5% to 25% [9,10]. In occupationally exposed persons in Germany, seroprevalence was higher than in the common population with 3.3% up to 43% in forest workers, gardeners and farmers [11].

Recently, Groll et al. established an ELISA for the detection of antibodies against the non-structural protein 1 (NS1) of TBEV [12]. The idea was first presented by Albinsson et al., who proposed that NS1 might be a valuable tool in identifying TBE-infected among TBE-vaccinated people [13]. The NS1 protein of flaviviruses is produced during virus replication in cells and also secreted into the blood stream during TBEV infection, inducing antibody production in the infected person. Therefore, it is a reliable indicator of a current and past TBEV infection. Using this assay, infection-induced and vaccine-induced antibodies can be distinguished. Since the development of this ELISA, it has become technically feasible to conduct seroprevalence studies investigating infection rates.

We present seroprevalence data from a highly TBEV-endemic district in south-western Germany. The NS1 IgG ELISA was used in combination with a TBEV IgG ELISA and other serological tests to study the TBEV IgG

prevalence in blood donors, to evaluate the proportion of TBEV-vaccinated and TBEV-infected persons in this population and to calculate the manifestation index of human TBEV infections. Similar antibody prevalence studies had been conducted in this region in 1964 and 1986 [9,10]. Therefore, a secondary aim was to provide evidence on the temporal development of the TBEV antibody prevalence.

## Methods

### Tick-borne encephalitis case definitions, manifestation index and incidence

Case definitions are issued by the Robert Koch Institute (RKI). The German case definition differs from the definition issued by the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), as it includes also febrile forms of TBEV infections without CNS symptoms. The Robert-Koch Institute has since 2001 made the reported number of human TBEV infections available under open access in different formats, spatial and temporal resolutions [6].

The manifestation index (MI) in the region of interest (ROI) was calculated as a percentage:

$$MI (\%) = \frac{I(\text{notified})}{I(NS1)} \times 100$$

The average notification-based incidence per 100,000 per year in the ROI was calculated on the basis of detailed 10-year national notification data:

$$I(\text{notified}) = \frac{a}{d} \times \frac{100,000}{10}$$

The average NS1 IgG-based incidence per 100,000 per year in the ROI was calculated on the basis of data on the NS1 IgG seroprevalence (spanning 20 years):

$$I(NS1) = \frac{b}{c} \times \frac{100,000}{20}$$

Whereby *a* represents the notified number of TBEV infections in the ROI spanning 10 years, *b* the number of NS1 IgG-positive samples in the ROI, *c* the number of all tested samples in the ROI and *d* the number of inhabitants in the ROI.

### Blood sample collection and sites of sampling

The collection of blood samples was conducted in collaboration with the regional blood transfusion/donation service (Deutsches Rotes Kreuz, DRK Blutspendedienst Baden-Wuerttemberg/Hessen gGmbH, Frankfurt a.M., Germany). Reminders of blood samples were used for further TBEV testing. Flyers summarising the study

## KEY PUBLIC HEALTH MESSAGE

### What did you want to address in this study?

We wanted to find out how many infections with TBEV (tick-borne encephalitis virus) take place in an area in south-western Germany with high risk for this infection. Vaccinated and infected people both have TBEV antibodies. With a new test, we can distinguish between them and calculate the exact frequency of infection. Combined with officially notified TBEV infections, we can estimate the ratio of asymptomatic to symptomatic TBEV infections.

### What have we learnt from this study?

We found that about one in 20 blood donors in a high-risk district acquired a TBEV infection. This figure is more than five-fold higher than in a similar study in non-vaccinated blood donors in the same district in 1986. Based on our findings only about 2% developed a symptomatic disease that prompted specific diagnostic and led to notification.

### What are the implications of your findings for public health?

The risk of TBEV infection is much higher than previously assumed. In addition, the proportion of infected people developing severe infection seems to be smaller than estimated in earlier studies. This higher risk of infection implies changes in the environment affecting the virus' transmission cycle and/or changes in human behaviour which increase the infection risk. We should ensure high vaccination rates for people who are exposed.

information were handed over to all voluntary blood donors at the donation site before the sampling began. Anonymised datasets for each sample included age, sex and postal code. Samples were collected between May and September 2021 in the Ortenaukreis, a county highly endemic for TBEV in the federal state of Baden-Wuerttemberg, south-western Germany. It is neighbouring France and has about 430,000 inhabitants [14]. In this rural Black-Forest region with three interspersed east-west river valleys, 408 TBE cases were notified between 2001 and 2021 [5]. For all calculations, we used a dataset provided by the local public health authorities. This dataset is spanning the time from 2011 to 2021 and is edited on a subdistrict/municipality level for our purposes.

### Enzyme-linked immunosorbent assays

For a comprehensive overview of the study, flow of samples and tests applied at each stage we refer to Figure 1. For the screening of IgG antibodies against TBEV, a TBEV IgG ELISA was performed using commercially available kits (Euroimmun AG, Lübeck, Germany). All plasma samples reacting positive in the screening ELISA were re-tested with an in-house TBEV NS1 IgG ELISA described previously [12]. Patient and control sera were tested in triplicate and interpreted as positive or negative with respect to their mean optical density as described [12].

### Microneutralisation assay

The microneutralisation assay (mNA) was conducted according to a standardised protocol which was adapted to TBEV [15]. We cultivated TBEV (strain

Neudoerfl; kindly provided by Prof. F.X. Heinz, Institute of Virology, Medical University of Vienna, Austria) in A549 cells. The antibody titres corresponding to the highest serum dilution showing complete inhibition of cytopathic effect in both wells were reported. Samples were classified as either neutralisation titre (NT)-borderline (titre = 10), as negative (titre < 10) or NT-positive (titre ≥ 20). All borderline and negative samples were tested again by indirect immunofluorescence test (IIFT) to exclude that the ELISA results were cross-reactions with other flaviviruses infections or vaccinations.

### Indirect immunofluorescence test

Plasma with antibody titres of < 20 in the mNA were tested with a dilution of 1:10 in the indirect immunofluorescence assay using the IIFT Flavivirus Mosaik 1 (IgG) (TBEV, WNV, YFV, JEV) and the Mosaik dengue virus types 1–4 (IgG) (both Euroimmun).

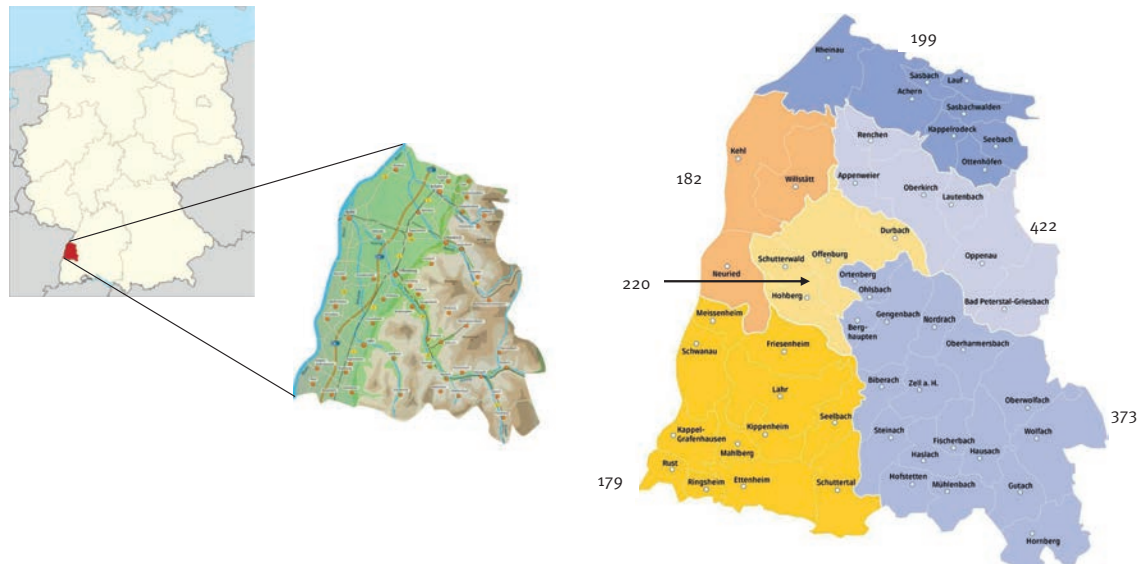
## Results

### Study population

Overall, 2,220 samples were included in the study. The mean age of the blood donors was 45.4 years (standard deviation: 15.4 years). See Figure 2 for age and sex distribution. There were 1,248 male donors and 972 female donors. The mean age of the male donors was 47.1 years (standard deviation: 15.0 years), the mean age of the female donors was 43.2 years (standard deviation: 15.8 years). The vast majority of the study population reported their place of residence within the district Ortenaukreis (1,824/2,220).

### FIGURE 1

Study flowchart, Ortenaukreis, Germany, 2021 (n = 2,220)



DENV: dengue virus; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; IgG: immunoglobulin G; IIFT: indirect immunofluorescence test; JEV: Japanese encephalitis virus; TBEV: tick-borne encephalitis virus; YFV: yellow fever virus.

## TBEV IgG antibody seroprevalence

From the 2,220 included samples, 57% (1,257/2,220) tested positive using the screening TBEV IgG ELISA (Table). There were an additional 112 borderline results, which we categorised for calculating purposes in this first overview as negative. The mean age of the positive individuals was 47.2 years (standard deviation: 15.6 years). When excluding the borderline results, 38% of the samples were negative (851/2,220), 357 from female and 494 from male donors. The average age of the negative individuals was 48.4 years for males ( $n=494$ ; standard deviation: 15.2 years) and 45.5 years for females ( $n=357$ ; standard deviation: 16.1 years). From the 1,257 TBEV IgG-positive participants, 683 (54.7%) were male and 574 (59.1%) were female.

### TBEV NS1 IgG seroprevalence

All samples that tested positive or borderline ( $n=1,369$ ) in the TBEV IgG ELISA were subsequently tested with the TBEV NS1 IgG ELISA to distinguish between vaccination-induced and infection-induced TBEV IgG antibodies. Of the overall initial 2,220 samples, 125 tested positive for infection-induced TBEV NS1 IgG antibodies, resulting in a TBEV NS1 IgG seroprevalence of 5.6% in the study population. Samples with borderline results were categorised as TBEV NS1 IgG-negative for calculating purposes (Table and Figure 3).

## Incidence

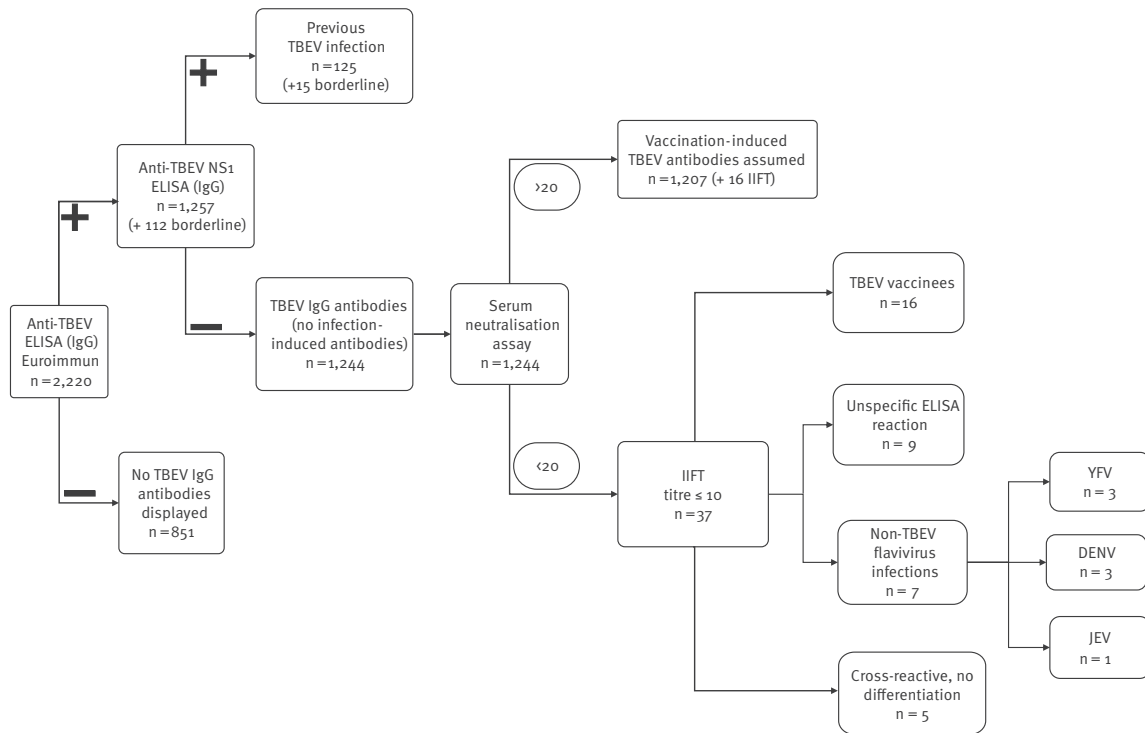
Assuming that TBEV NS1 IgG can be detected for ca 20 years after TBEV infection (data not shown and [12]), the incidence could be calculated. We retrieved 408 notified TBEV infections from the SurvStat database of the RKI [5], spanning the period from 2001 to 2021. We calculated on this basis a yearly reported average incidence of 4.69 notified cases per 100,000 inhabitants. In order to calculate the real incidence based on NS1 ELISA data, we used the number of inhabitants recorded by the public authorities for each municipality in the district of interest. For comparison, the calculated yearly average incidence based on the NS1 ELISA findings (Figure 4) resulted in 283 infections per 100,000 inhabitants.

## Manifestation index

We assumed that the TBEV infections notified during the period of interest were somehow symptomatic, because otherwise diagnostic procedures would not have been done. Therefore, we categorised them as symptomatic and calculated, using the NS1 IgG ELISA data (categorised as overall infections), an overall manifestation index of 2% in the studied high-endemic district.

**FIGURE 2**

Age and sex distribution of the study population, blood donors, Ortenaukreis, Germany, May–September 2021 (n = 2,220)



### Spatial analysis of TBEV IgG antibody seroprevalence, TBEV NS1 IgG seroprevalence and manifestation index

For a more detailed analysis (appended as additional information in Supplementary Table S1), we subdivided the data on the basis of the geographical characteristics in the district of interest (Figure 4). As mentioned above, the district contains three interspersed east-west valleys (Achertal, Renthalt and Kinzigtal) and the Rhine River plain. The local public health authorities provided notification data spanning the years 2011 to 2021 on municipality level.

The reported average incidence for the Achertal was five cases per 100,000 inhabitants per year. The calculated average incidence from our TBEV NS1 IgG data was 199 per 100,000 inhabitants per year. In the Renthalt, the notified incidence was nine per 100,000 inhabitants per year, whereas the incidence derived from our TBEV NS1 IgG data was 422 per 100,000 inhabitants per year. The reported average incidence for Kinzigtal was nine per 100,000 inhabitants per year, while the calculated average incidence from our TBEV NS1 IgG data was 373 per 100,000 inhabitants per year. The remaining sub-regions in the Ortenaukreis, Hanauerland, Offenburg and Lahr had a calculated average TBEV NS1 IgG incidence between 179 and 220

per 100,000 inhabitants per year – a detailed overview is included in Supplementary Table S1. It is striking that the reported TBE incidence in the Hanauerland area was overall low, with one per 100,000 inhabitants per year, compared with the TBEV NS1 IgG incidence in our analysis of 182 per 100,000 inhabitants per year. In this sub-region, the municipality of Neuried with no notified TBE cases, had a calculated average TBEV NS1 IgG incidence of 417 per 100,000 inhabitants per year. The dataset from that municipality included 36 blood donor samples, of which 27 were TBEV IgG-positive. Three samples were TBEV NS1 IgG-positive.

A further spatial analysis indicated higher incidences in the distant parts of the three valleys municipalities which might be hotspots for TBE infections. In detail, samples from Oberwolfach and Wolfach confirm, beside a high reported TBE incidence, a high TBEV NS1 IgG incidence reaching more than 700 per 100,000 inhabitants per year. In the neighbouring Renthalt the results from the distant villages Oppenau and Bad-Griesbach revealed similar high TBEV NS1 IgG incidence data.



TABLE

Age-specific TBEV antibody seroprevalence based on IgG ELISA, Ortenaukreis, Germany, May–September 2021 (n=2,200)

Age group (years)	Total	TBEV IgG-positive		TBEV IgG-negative		TBEV IgG-borderline		TBEV IgG-positive or borderline and					
								NS1 IgG-positive		NS1 IgG-negative		NS1 IgG-borderline	
		%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
18	23	70	16	30	7	0	0	4	1	65	15	0	0
19–24	281	64	180	33	94	2	7	9	24	57	160	1	3
25–29	266	63	167	34	91	3	8	8	21	56	148	2	6
30–34	191	58	110	39	74	4	7	5	10	56	107	0	0
35–39	106	60	64	35	37	5	5	7	7	58	62	0	0
40–44	154	63	97	29	45	8	12	6	9	64	99	1	1
45–49	162	58	94	35	56	7	12	5	8	60	97	1	1
50–54	311	56	173	40	123	5	15	6	19	54	168	0	1
55–59	308	48	148	44	136	8	24	4	11	51	158	1	3
60–64	217	56	122	39	85	5	10	3	6	58	126	0	0
≥65	201	43	86	51	103	6	12	4	9	44	89	0	0
Total	2,220	57	1,257	38	851	5	112	6	125	55	1,229	1	15

IgG: immunoglobulin G; NS1: non-structural protein 1; TBEV: tick-borne encephalitis virus.

### Microneutralisation assay and indirect immunofluorescence test

Anti-TBEV IgG antibodies were confirmed in 62% (1,369/2,220) of our tested samples (112 borderline samples included). The vast majority of the screening IgG-positive and NS1 IgG-negative samples showed neutralising antibody titres  $\geq 20$  in the mNA (97%; 1,207/1,244) and were therefore confirmed the IgG as TBEV-specific. The 37 samples that were classified as TBEV neutralisation antibody-negative (titre < 10) or TBEV neutralisation antibody-borderline (titre = 10) in the mNA were tested by IIFT and four could retrospectively be confirmed for TBEV IgG antibodies. Another 12 samples displayed a titre of 10 in the mNA and showed no flavivirus infection other than TBEV in the IIFT. These overall 16 donors were categorised as vaccinees, whose vaccination dated some time back, causing fading antibody titres. They were added to the 1,207 vaccinees whom we could confirm via mNA so that 98% (1,223/1,244) samples could ultimately be confirmed for TBEV-specific neutralising antibodies. Of the remaining 21 samples, nine are assumed to have reacted non-specifically in the Euroimmun screening ELISA, showing no mNA titre and no reaction in the IIFT. In addition, we found seven samples showing infections with flaviviruses other-than-TBEV in the IIFT, including three that showed antibodies against YFV, one that displayed antibodies against JEV and three against DENV. Finally, five samples could not be differentiated due to cross-reactivity in the IIFT.

### Discussion

Although TBE is a well-known disease in Europe, a number of epidemiological questions regarding the infection rate, the incidence and the manifestation index have remained unanswered for decades since the introduction of TBE vaccines, as differentiation

between infection-induced and vaccine-induced antibodies in serological studies has been hampered. The present study approximates these unanswered questions of the exact TBEV infection incidence and manifestation index in a high-endemic district of southern Germany.

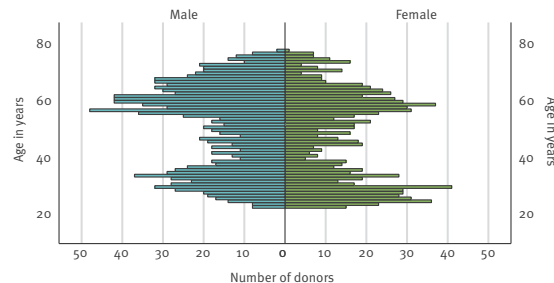
Using the recently established TBE NS1 IgG assay [12], the NS1 seroprevalence for the entire study sample indicated that 5.6% of the population had a past TBEV infection. This infection rate is in line with neighbouring countries such as Switzerland [16] or France [17] but is higher than in Lithuania [18]. Kaiser et al. detected an TBEV IgG seroprevalence of 9.4% in non-vaccinated people in south-western Germany. This finding is almost exactly the prevalence of 9.1% we found in our TBE IgG ELISA-positive group [19].

In Germany, the first TBEV vaccine was licensed in 1981. In the 1980s, highly exposed population groups like forest workers were vaccinated with priority. In 1986, still before the general national recommendations for TBEV vaccination in high-risk regions, Ackermann et al. conducted a TBEV seroprevalence study in blood donors of the same district as investigated in our study – the Ortenaukreis, Federal State of Baden-Wuerttemberg [10]. Neutralising antibodies against TBEV were found in 0.8% of the samples. Comparing our results with these historical data, infection-induced TBEV seroprevalence has increased ca 7-fold in this particular district over the past 40 years.

Our study confirmed a manifestation index of ca 2% and a high incidence of predominantly asymptomatic TBEV infections (>250/100,000), which exceeded the incidence of notified cases (4.7/100,000) by magnitudes. It should be kept in mind that TBEV case definitions differ within the European Union. The ECDC

**FIGURE 3**

Seroprevalence of TBEV NS1 antibodies, by sex, blood donors, Ortenaukreis, Germany, May–September 2021 (n = 1,248)



IgG: immunoglobulin G; NS1: non-structural protein 1; TBEV: tick-borne encephalitis virus.

defines TBEV cases as occurrence of CNS symptoms in addition to a confirmed laboratory result, while in Germany, influenza-like or even asymptomatic disease meets the TBEV case definition issued by the RKI. The lack of a uniform case definition needs to be taken into consideration when comparing our calculated values with previous studies which may have used other definitions than in our study. However, our setting including all TBE cases, irrespective of the clinical symptoms, better approximates the true biological and epidemiological situation as if only severe clinical cases are included.

Our findings suggest that the immune protection rate (the proportion of TBEV neutralisation antibody-positive study participants) in the study population might be higher than reported in previous studies evaluating TBEV vaccination rates [20]. In the screening ELISA, 62% of our tested samples displayed TBEV IgG antibodies. For 98%, the IgG-positive and NS1-negative samples could be confirmed using the mRNA assay. Our study population consisted of blood donors, who are considered to have a higher awareness of health-associated topics such as vaccinations and preventive medicine than the average population. Therefore, a direct comparison to the general population should be made only cautiously. Notably, the age of our participants ranged from 18 to 72 years, excluding children and a part of the elderly population.

Tick-borne encephalitis virus occurs in well-defined areas, so called TBEV microfoci. The five-fold higher number of TBEV infections compared with blood donors from 1986 could be explained by different biotic, abiotic and anthropogenic factors [9]. Increased tick activity following changing climate conditions could be a possible reason for increased infection rates. A study from Sweden illustrates that disease incidence was correlated with mild winters and early arrival of spring [21]. Notably, increasing host animal populations as well as more inhabitants around TBEV foci could

contribute to higher TBEV incidences. However, in our district of interest, the rural structure of the valleys and population densities has been roughly constant over the past decades. Increased notification and awareness, especially in the local primary care system, could be a crucial factor for the rise in case numbers as well.

When comparing the six subregions in the Ortenaukreis, TBEV infection rates were clustered in specific areas. The incidences were particularly high in the three valleys (199/100,000 in Achertal, 422/100,000 in Renchtal and 373/100,000 in Kinzigtal), whereas they were lower in the Rhine River plane. The reason is probably the natural spread of TBEV microfoci in nature along geographical structures such as rivers or valleys. The distribution of these microfoci in a landscape is linked to local climate and microclimate conditions. The TBEV infection rates were especially high in Neuried, an area close to the Rhine River. There were no notified cases in this municipality. We hypothesise that there might be a nearby undiscovered natural TBEV microfocus in the tick population or that anthropogenic factors (e.g. high intermittent migration/travelling into highly endemic areas) might be responsible.

Our study has several limitations. There might be a certain bias in the composition of our sample population as shown in the population diagram. The age distribution suggests a gap regarding middle-aged blood donors. This biased age distribution might have led to a manifestation index calculated too low, as it is known that disease severity increases with age. However, as shown in the age distribution of human cases in Germany, the case numbers increase especially in those 50 years and older [22]. Therefore, the bias may be negligible. When discussing the present results, it should be kept in mind that the population sample analysed may not be representative for other regions in Germany because of different biotic, abiotic and anthropogenic factors.

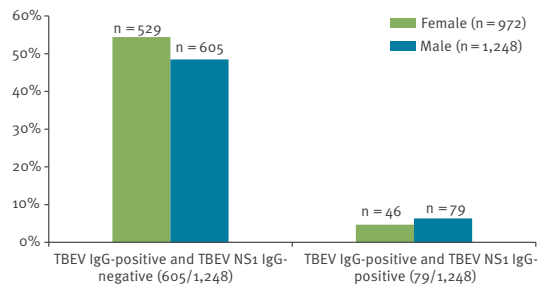
To date, it is not clear if TBE vaccination induces sterile immunity in humans. Therefore, we cannot estimate whether or not the protected 62% would have produced an NS1 antibody response after infection. This question might, however, influence our manifestation index. In a model using vaccinated mice, virus replication took place [23]. If the vaccination in humans results in protection but not sterile immunity, a number of TBEV NS1 IgG-positive blood donors may have been infected after vaccination and produced serological evidence of infection in the absence of clinical disease. This might have led to a much smaller manifestation index as seen under natural non-vaccinated conditions. However, we have so far not been able to distinguish between pre- or post-vaccination infections.

The broad recommendation of TBEV vaccinations impacts the overall occurrence of TBEV infections. Vaccination failures, resulting in TBEV breakthrough infections, are rare – ranging from 1.7% to 6.7% of



**FIGURE 4**

Calculated average TBEV incidence based on a positive TBEV NS1 IgG ELISA (per 100,000 inhabitants per year), regional data on a subdistrict scale, Ortenaukreis, Germany, extrapolated from data for May–September 2021 (n = 2,220)



NS1: non-structural protein 1; TBEV: tick-borne encephalitis virus.

Numbers next to the subdistricts (differently coloured) of the district map indicate the calculated corresponding TBEV incidence based on a positive TBEV NS1 IgG ELISA (per 100,000 inhabitants per year).

the reported TBEV infection cases in Germany [24]. The current situation with an estimated vaccination rate of 30–40% in the population is not comparable to the setting of a de facto unvaccinated population in older epidemiological studies [9,10]. This results in an underestimation of the manifestation index for TBEV infections which is often cited in the literature as ca 10%, which dates back to a study of 1965 [8].

In this study, we used the Euroimmun TBEV IgG ELISA for screening. Since the ELISA method in general is very sensitive, yet not as specific, we confirmed all screening ELISA-positive and NS1 IgG ELISA-negative samples by mRNA. We assume that samples without detectable neutralising capacity constitute vaccination failures, vaccinations given some time ago or cross-reactivity with a non-TBEV flavivirus infection. A negligible number of our samples tested positive for other flaviviruses (0.06%), e.g. DENV and YFV. These viruses are not endemic in Europe and are considered to be travel-related. While we did not review our participants' vaccination status against YFV and JEV, it is known that these viruses induce of cross-reactive antibodies against TBEV [25]. The rate of other flavivirus vaccinations and/or infections may be higher than observed in this study as the primary inclusion criterion was the presence of TBEV IgG antibodies. Therefore, we have missed all sera which reacted mono-specifically against the tested flaviviruses without cross-reactions against TBEV. These limitations need to be considered when interpreting the results. A further critical point is the inability of the NS1 IgG assay to detect past (>20 years) TBEV infections due to fading antibodies. The 20-year threshold was taken into account when calculating incidences, however, this threshold was chosen

somewhat arbitrarily as the evidence for this approach was based on a few cases of TBEV infection with persistent antibodies after about 20 years [12].

## Conclusion

Our study contributes to our understanding of the TBEV infection incidence and manifestation index in a high-endemic district of southern Germany. Notably, there seems to be an increase in TBEV infection rates, as shown for the Ortenaukreis. We present a comprehensive update on the seroprevalence and incidences, which indicate a rise in TBEV infections in the last decades in the district Ortenaukreis.

## Ethical statement

A formal approval of an ethics committee was not required, because each donor gave, on a routine basis, written consent to the potential scientific use of rest samples in an anonymised form.

## Funding

This project was funded by Bavarian Nordic GmbH Deutschland. Bavarian Nordic was involved in the design of the study. There were no restrictions in data collection, analysis, and as well as interpretation of data; writing of the report; no restrictions regarding the submission of the report for publication.

## Conflict of interest

JPB, WVK, GD received financial support and lecture fees from Pfizer GmbH Deutschland and Bavarian Nordic GmbH Deutschland.

## Authors' contributions

Euringer K - laboratory work and drafting the manuscript, Grl P - laboratory work, drafting manuscript, Kaier K - statistical adviser, reviewing the manuscript, analysis, Schmidt M, Müller-Steinhardt and Peilstöcker J - blood sampling, providing samples, drafting manuscript, Rauscher B and Bressau E - revising the manuscript, providing regional public health data, Kern WV, Dobler G and Borde J - project management, supervision, revising the manuscript, calculations, laboratory work.

## References

1. Bogovic P, Strle F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J Clin Cases*. 2015;3(5):430–41. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i5.430> PMID: 25984517
2. Ruzek D, Avšič Županc T, Borde J, Chrdle A, Eyer L, Karganova G, et al. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Res*. 2019;164:23–51. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.014> PMID: 30710567
3. Kriz B, Benes C, Daniel M. Alimentary transmission of tick-borne encephalitis in the Czech Republic (1997–2008). *Epidemiol Mikrobiol Immunol*. 2009;58(2):98–103. PMID: 19526924
4. Barzon L. Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe. *J Clin Virol*. 2018;107:38–47. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.08.007> PMID: 30176404

5. Robert Koch Institut (RKI). SurvStat@RKI 2.0. Berlin: RKI. [Accessed: 16 Sep 2022]. Available from: <https://survstat.rki.de>
6. Robert Koch Institute (RKI). RKI-Ratgeber Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) und verwandte Virusenzephalitiden (TBE, tick-borne encephalitis). [RKI guide for tick-borne encephalitis (TBE) and related viral encephalitides]. Epidemiologisches Bulletin 2022;16. German. Available from: [www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2022/16/Art\\_01.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2022/16/Art_01.html)
7. Kaiser R, Vollmer H, Schmidtke K, Rauer S, Berger W, Gores D. Verlauf und Prognose der FSME. Nervenarzt. 1997;68(4):324-30. <https://doi.org/10.1007/s001150050130> PMID: 9273461
8. Groll E, Krausler J, Kunz C, Moritsch H. Untersuchungen über die Morbidität und stille Durchseuchung einer Population in einem Endemiegebiet der Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (tick-borne encephalitis). [Studies on the morbidity and latent infection of a population in an endemic area of early summer meningoencephalitis (tick-borne encephalitis)]. Arch Gesamte Virusforsch. 1965;15:151-8. German. <https://doi.org/10.1007/BF01257726> PMID: 14271026
9. Ackermann R, Krüger K, Roggendorf M, Rehse-Küpper B, Mörtter M, Schneider M, et al. Die Verbreitung der Frühsommer-Meningoenzephalitis in der Bundesrepublik Deutschland. [Spread of early-summer meningoencephalitis in the Federal Republic of Germany]. Dtsch Med Wochenschr. 1986;111(24):927-33. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1068558> PMID: 3709370
10. Scheid W, Ackermann R, Bloedhorn H, Löser R, Leidtke G, Skrtić N. Untersuchungen über das Vorkommen der Zentraleuropäischen Enzephalitis in Süddeutschland. [Studies on the occurrence of the central European encephalitis in southern Germany]. In: Scheid W, Ackermann R, Bloedhorn H, Küpper B, Winkens I. Untersuchungen zur Epidemiologie des Virus der Lymphocytären Choriomeningitis (LCM) in Westdeutschland [Studies on the epidemiology of the lymphocytic choriomeningitis (LCM) virus in West Germany]. Wiesbaden: VS Verlag für Sozialwissenschaften; 1966;61-82. German. ISBN: 978-3-663-06582-1. <https://doi.org/10.1007/978-3-663-07495-3> <https://doi.org/10.1007/978-3-663-07495-3>
11. Oehme R, Hartelt K, Backe H, Brockmann S, Kimmig P. Foci of tick-borne diseases in southwest Germany. Int J Med Microbiol. 2002;291(Suppl 33):22-9. [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(02\)80005-4](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(02)80005-4) PMID: 12141751
12. Groll P, Bestehorn-Willmann M, Zange S, Borde JP, Dobler G, von Buttlar H. Tick-borne encephalitis virus nonstructural protein 1 IgG enzyme-linked immunosorbent assay for differentiating infection versus vaccination antibody responses. J Clin Microbiol. 2020;58(4):e01783-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01783-19> PMID: 31969423
13. Albinsson B, Rönnerberg B, Vene S, Lundkvist Å. Antibody responses to tick-borne encephalitis virus non-structural protein 1 and whole virus antigen-a new tool in the assessment of suspected vaccine failure patients. Infect Ecol Epidemiol. 2019;9(1):1696132. <https://doi.org/10.1080/20086866.2019.1696132> PMID: 31839903
14. Bevölkerung nach Nationalität und Geschlecht – vierteljährlich. [Population by nationality and sex]. Stuttgart: Statistisches Landesamt Baden-Württemberg. [Accessed: 8 Mar 2023]. German. Available from: [https://www.statistik-bw.de/BevoelkGebiet/Bevoelk\\_I\\_D\\_A\\_vj.csv](https://www.statistik-bw.de/BevoelkGebiet/Bevoelk_I_D_A_vj.csv)
15. World Organisation for Animal Health (WOAH). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). 7th ed. Volume 1. Paris: WOAH; 2012.
16. Matile H, Aeschlimann ARW. Seroepidemiological investigations on the incidence of TBE in man and dog in Switzerland. In: Kunz C (editor). International symposium on tick-borne encephalitis. Wien: Facultas Verlag; 1979.
17. Collard M, Gut JP, Christmann D, Hirsch E, Nastorg G, Sellal F, et al. L'encéphalite à tiques en Alsace. [Tick-borne encephalitis in Alsace]. Rev Neurol (Paris). 1993;149(3):198-201. PMID: 8235212
18. Juceviciene A, Vapalahti O, Laiskonis A, Ceplikiene J, Leinikki P. Prevalence of tick-borne-encephalitis virus antibodies in Lithuania. J Clin Virol. 2002;25(1):23-7. [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(01\)00215-3](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(01)00215-3) PMID: 12126718
19. Kaiser R, Kern A, Kampa D, Neumann-Haefelin D. Prevalence of antibodies to Borrelia burgdorferi and tick-borne encephalitis virus in an endemic region in southern Germany. Zentralbl Bakteriol. 1997;286(4):534-41. [https://doi.org/10.1016/S0934-8840\(97\)80057-6](https://doi.org/10.1016/S0934-8840(97)80057-6) PMID: 9440203
20. Erber W, Schmitt HJ. Self-reported tick-borne encephalitis (TBE) vaccination coverage in Europe: Results from a cross-sectional study. Ticks Tick Borne Dis. 2018;9(4):768-77. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.02.007> PMID: 29501619
21. Lindgren E, Gustafson R. Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change. Lancet. 2001;358(9275):16-8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)05250-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)05250-8) PMID: 11454371
22. Robert Koch-Institut. FSME: Risikogebiete in Deutschland (Stand: Januar 2022). [TBE: risk areas in Germany (as of January 2022)]. Epid Bull 2022;9:3-21. German. Available from: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2022/09/Art\\_01.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2022/09/Art_01.html)
23. Kreil TR, Maier E, Fraiss S, Attakpah E, Burger I, Mannhalter JW, et al. Vaccination against tick-borne encephalitis virus, a flavivirus, prevents disease but not infection, although viremia is undetectable. Vaccine. 1998;16(11-12):1083-6. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)80102-3](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)80102-3) PMID: 9682362
24. Dobler G, Kaier K, Hehn P, Böhmer MM, Kreusch TM, Borde JP. Tick-borne encephalitis virus vaccination breakthrough infections in Germany: a retrospective analysis from 2001 to 2018. Clin Microbiol Infect. 2020;26(8):1090.e7-13. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.12.001> PMID: 31843655
25. Chan KR, Ismail AA, Thergarajan G, Raju CS, Yam HC, Rishya M, et al. Serological cross-reactivity among common flaviviruses. Front Cell Infect Microbiol. 2022;12:975398. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.975398> PMID: 36189346

## License, supplementary material and copyright

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) Licence. You may share and adapt the material, but must give appropriate credit to the source, provide a link to the licence and indicate if changes were made.

Any supplementary material referenced in the article can be found in the online version.

This article is copyright of the authors or their affiliated institutions, 2023.

### 3.2 Eigenanteil Publikation 2

Serological Protection Rates against TBEV Infection in Blood Donors from a Highly  
Endemic Region in Southern Germany

Gerhard Dobler <sup>1,2,†</sup>, Kathrin Euringer <sup>1,3,†</sup>, K. Kaier <sup>4</sup>, and Johannes P. Borde <sup>3,5,\*</sup>

<sup>1</sup>Bundeswehr Institute of Microbiology, Neuherbergstraße 11, 80937 München, Germany

<sup>2</sup>Parasitology Unit, University of Hohenheim, Emil-Wolff-Straße 34, 70599 Stuttgart, Germany

<sup>3</sup>Division of Infectious Diseases, Department of Medicine II, University of Freiburg Medical Center and Faculty of Medicine, 79098 Freiburg, Germany

<sup>4</sup>Institute of Medical Biometry and Statistics, Faculty of Medicine and Medical Center, University of Freiburg, Stefan-Meier-Straße 26, 79098 Freiburg, Germany

<sup>5</sup>Gesundheitszentrum Oberkirch, Am Marktplatz 8, 77704 Oberkirch, Germany

\*Correspondence: Johannes.borde@web.de

†These authors contributed equally to this work.

Vaccines (Basel) 2023; 11(3):522

Impact Factor: 4,961 (2021)

Eingereicht: 22.01.2023

Akzeptiert: 15.02.2023

Veröffentlicht: 23.02.2023

Stellungnahme zum Eigenanteil der Publikation:

Die Idee für diese Folgestudie entwickelten GD und JPB. Die Laborarbeit führte ich eigenständig mit Unterstützung von Mitarbeitern des IMBs durch. Die Aufbereitung der Ergebnisse führte ich eigenständig durch, wobei GD und JPD mich bei der Auswertung der Ergebnisse unterstützen. Die Literaturrecherche erfolgte durch mich unter Beratung von GD und JPB. Die statistische Auswertung der Daten übernahmen KK und JPB. Das Manuskript erstellte ich eigenständig, wobei GD und JPB die Revision vornahmen. Die endgültige Version des Manuskripts erfolgte mithilfe aller Koautoren.

## 3.2.1 Publikation 2



vaccines



## Article

## Serological Protection Rates against TBEV Infection in Blood Donors from a Highly Endemic Region in Southern Germany

Gerhard Dobler <sup>1,2,†</sup> , Kathrin Euringer <sup>1,3,†</sup>, Klaus Kaier <sup>4</sup> and Johannes P. Borde <sup>3,5,\*</sup> <sup>1</sup> Bundeswehr Institute of Microbiology, Neuherbergstraße 11, 80937 München, Germany<sup>2</sup> Parasitology Unit, University of Hohenheim, Emil-Wolff-Straße 34, 70599 Stuttgart, Germany<sup>3</sup> Division of Infectious Diseases, Department of Medicine II, University of Freiburg Medical Center and Faculty of Medicine, 79098 Freiburg, Germany<sup>4</sup> Institute of Medical Biometry and Statistics, Faculty of Medicine and Medical Center, University of Freiburg, Stefan-Meier-Straße 26, 79098 Freiburg, Germany<sup>5</sup> Gesundheitszentrum Oberkirch, Am Marktplatz 8, 77704 Oberkirch, Germany

\* Correspondence: johannes.borde@web.de

† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Dobler, G.; Euringer, K.; Kaier, K.; Borde, J.P. Serological Protection Rates against TBEV Infection in Blood Donors from a Highly Endemic Region in Southern Germany. *Vaccines* **2023**, *11*, 522. <https://doi.org/10.3390/vaccines11030522>

Academic Editors: Artur Sulik and Kacper Toczyłowski

Received: 22 January 2023

Revised: 11 February 2023

Accepted: 15 February 2023

Published: 23 February 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Background: Tick-borne encephalitis (TBE) is the most significant tick-borne disease in Europe and Asia, with more than 10,000 cases per year worldwide. A surge of reported TBE cases can be observed despite the availability of highly efficient vaccines. There is little known about the serological immune protection rate of the population in Germany. The seroprotection rate is defined as the presence of neutralizing antibodies. In contrast, the vaccination rate, as defined by public health agencies, may differ from the true protection rate in a population. Materials and Methods: 2220 blood samples from inhabitants of the county Ortenaukreis in the Federal State of Baden-Württemberg in Germany were included in the study. These were tested for anti-TBEV IgG antibodies by an anti-TBEV-IgG-ELISA. Subsequently, all TBEV-IgG positive samples were confirmed for neutralizing antibodies in the micro serum neutralization assay. Results: From the overall 2220 samples, 2104 were included in the comparison because of the selection of specific age groups (ages 20–69). In our sample size, we found an average serological protection rate (presence of neutralizing antibodies) of 57% (518/908) for the female blood donors and of 52% (632/1196) for the male blood donors. Discussion: In this study, we present new findings on a highly endemic region in southern Germany. Additionally, we present current data regarding the serological TBEV protection rates in the Ortenaukreis in southern Germany and compare these with a dataset published by the RKI, which is based on vaccination reports of the primary care providers and health care insurers, and with a self-reporting study conducted by a vaccine manufacturer. Our results significantly exceed the official numbers of average active vaccination status by 23.2% for females and by 21% for males. This might indicate an even longer persistence of TBE-vaccination-induced antibody titers than previously assumed.

**Keywords:** TBEV; TBE; Germany; epidemiology; vaccines; protection; NS1

## 1. Introduction

Tick-borne encephalitis (TBE) is an emerging tick-borne disease in Europe and Asia with thousands of notified cases each year [1]. Its etiological agent is the TBE-Virus (TBEV), a single-stranded RNA virus of positive polarity (+ ss RNA). It belongs to the genus *Flavivirus* in the family *Flaviviridae* [2]. To date there are three confirmed virus subtypes, which include the European, Siberian and Far-Eastern subtypes [3]. Two other subtypes (Bakalian and Himalayan) have been proposed recently [4,5]. In Germany and Western Europe, so far only the European subtype has been detected to circulate. TBEV cycles in natural foci, between small mammals and ticks. It is typically transmitted to humans via a tick bite from *Ixodes ricinus*. In some cases, the milk of infected ungulates has caused alimentary TBEV cases in humans [6]. TBEV infection often causes sub-clinical TBE courses

which remain unnoticed, or non-specific symptoms where patients may also suffer from febrile, flu-like symptoms. In up to 30% of the symptomatic cases, a biphasic course with affection of the central nervous system (CNS) can occur [7], which may cause, in more than 40% of the cases, long-term or permanent neurological sequelae [8]. The case fatality rate for an infection with the European Subtype is ~1%, calculated on the basis of the notified TBEV infections [1].

Recently published findings from a high-endemic district, the Ortenaukreis in Baden-Wuerttemberg, southern Germany, point towards a surge of TBEV antibody seroprevalence despite the broad availability of highly efficient TBEV vaccines and respective recommendations [9]. Data on the vaccination rate in the German population are difficult to obtain. There are only few sources available for the estimation of the vaccination rates against TBEV in Germany. Annually, the vaccination certificates of German schools' starting pupils, (RKI, Epidemiological Bulletin 48/2022), are checked for vaccination against TBEV in addition to the generally recommended vaccines. In the most recent published control study (RKI, Epidemiological Bulletin 48/2022), the vaccination coverage in the federal state of Baden-Württemberg was on average 24.9% with wide ranges in the different districts. However, this rate includes only pupils with a complete basic vaccination status and a regular booster. The second source is statistics retrieved from German health insurers (RKI, Epidemiological Bulletin 47/2020). These data list exclusively persons with an active immunization status, based on the published national recommendations. However, after two vaccinations a protection rate of >80% may be achieved. On completing the basic vaccination course, the protection rate may last substantially longer than the proposed period of three (>50/60 years of age according to vaccine product) or five years (<50/60 years of age according to vaccine product), respectively, when a booster vaccination is officially recommended [10,11]. A third source is the study on vaccine coverage based on self-reporting conducted by the vaccine manufacturers. In one of these recent studies, a vaccination coverage of 27% was found for Germany with a range from 5 to 40% for the particular federal states [12]. However, this self-disclosure regarding the vaccination status by non-medical persons may be mistake-prone. In conclusion, all these surveys may miscalculate the true protection rates in the German population.

The seroprotection rate is defined as the presence of neutralizing antibodies, whereas an active vaccination status is based on the manufacturers' recommendations for regular basic vaccination schedules and booster intervals. Thus, the protection rate is independent from defined booster intervals or schedules. In Germany, there are two approved TBEV vaccines available (Encepur<sup>®</sup>, Bavarian Nordic; FSME-IMMUN<sup>®</sup>, Pfizer). Moreover, in Germany TBEV vaccination is recommended for all people with activities in nature in the defined TBE risk districts (RKI, Epidemiologisches Bulletin 9/2022), which are mainly located in the southern federal states of Bavaria and Baden-Wuerttemberg and the northern neighboring federal states of Saxony, Thuringia, Rhineland-Palatinate and Hesse. In addition, immunological protection induced by infection may account for the overall protection rate in the population, especially in high-endemic risk areas. Our data show that >10% of anti-TBE-IgG-positive blood donors in the Ortenaukreis show anti-TBE-NS1-IgG, which indicates a past TBE infection [9]. A differentiation between infection-induced and vaccine-induced antibodies has not been possible until recently, when an assay using the detection of anti-TBEV-NS1-IgG antibodies was introduced [13,14].

To date, no systematic studies investigating the current TBEV protection status, including vaccine-induced and infection-induced protection in the general population of risk in Germany, are available. This is due to the methodological difficulties of differentiating cross-reacting flavivirus antibodies using routine assays (ELISA). For the differentiation of these antibodies the neutralization test has to be used, which is labor-intensive, and the work with viable TBEV needs BSL-3 conditions.

In our study, we present a follow-up analysis of the recently conducted seroprevalence study in the highly endemic district Ortenaukreis, Baden-Wuerttemberg in south Germany [9]. Aside from the analysis of protection rates, we compare data from earlier studies

on TBEV protection rate in the population to our findings. Additionally, neutralizing antibody seroprevalence was correlated with different age groups and gender. The results allowed us to draw conclusions about the link between antibody quantity, confirmed by enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA), and antibody neutralizing capacity, proven by micro-serum neutralization assay (mSNA), as well.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Blood Samples

All methods and materials, notably the acquisition of blood samples, were previously explained in detail [9]. In brief, 2220 samples from blood donors in the Ortenaukreis, Baden-Wuerttemberg, Germany, were collected from May to December 2021. The donors' ages ranged from 18 to 72 years. As every donor gave written consent to make the anonymized test samples available for scientific purposes, no ethics approval was required.

### 2.2. Active Vaccination Status

Results on the vaccination coverage status were obtained from three different sources: the first source, the most recently published analysis of the students vaccination status, published by the RKI (RKI, Epidemiological Bulletin 48/2022); the second source, from the dataset on vaccination coverage as provided by the RKI and health insurers (RKI, Epidemiological Bulletin 47/2020); and the third source, from a survey based on self-reporting as provided by the vaccine manufacturers [11]. Based on the RKI and health insurers dataset (RKI, Epidemiological Bulletin 47/2020), the RKI provided an edited set of data representing the region/district of our interest—the Ortenaukreis, where the blood samples were collected [15].

### 2.3. Serological Methods

All 2220 samples were screened for TBEV-IgG antibodies with a conventional anti-TBEV-IgG-ELISA (Euroimmun, Lübeck, Germany). Positive and equivocal samples were subsequently tested in the recently validated anti-TBEV-NS1-IgG-ELISA [12]. With this assay, infection-induced antibodies were differentiated from vaccine-induced antibodies. All samples that reacted for TBEV-IgG antibodies, but not in the anti-TBE-NS1-IgG assay, were tested by mSNA in order to detect neutralizing antibodies and, therefore, confirm seroprotection [16]. For neutralization, 50 to 100 tissue culture infected doses of TBEV strain Neudoerfl were added to each serum in dilution 1:10 and 1:20. Samples with a titer of  $\geq 20$  in the mSNA were counted as vaccinees. As, to our experience, sera with specific antibodies to other flaviviruses (e.g., dengue virus, yellow fever virus, Japanese encephalitis virus, West Nile virus) may cross-react with low titers (1:10) in the mSNA, sera with titers of 1:10 were titrated by indirect immune fluorescence against different flaviviruses (Flavivirus Mosaic, Euroimmun, Luebeck, Germany) according to the manufacturer's instructions to exclude IgG antibodies against other cross-reacting flaviviruses.

For the titration in mSNA, sera were diluted from 1:10 to 1:1280 in twofold dilutions and tested in duplicate. The highest serum dilution which neutralized the virus was taken as the neutralizing titer.

### 2.4. Data Analysis

IBM SPSS version 28.0.0.0 was used to analyze the datasets. Descriptive statistics were calculated, and furthermore a linear regression model was applied to investigate the link between ODs and age, as well as SNA titers and age. Displayed are  $R^2$  and ANOVA test results proving or disproving the putative null-hypothesis.

## 3. Results

### TBEV-IgG protection rates

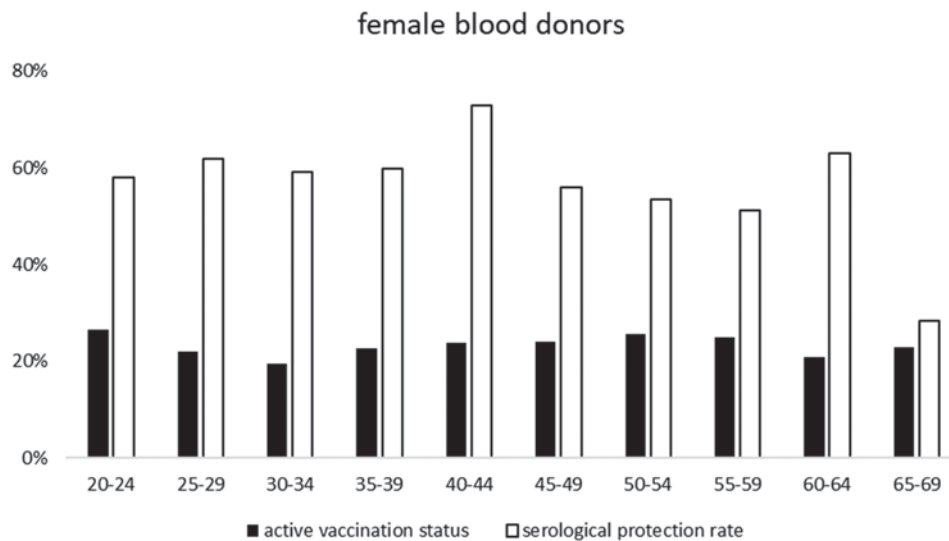
TBEV-IgG antibodies in the screening ELISA were detected in 57% (1257/2220) of the samples. Almost all (1244/1257) of these showed protective TBEV-IgG antibodies in the



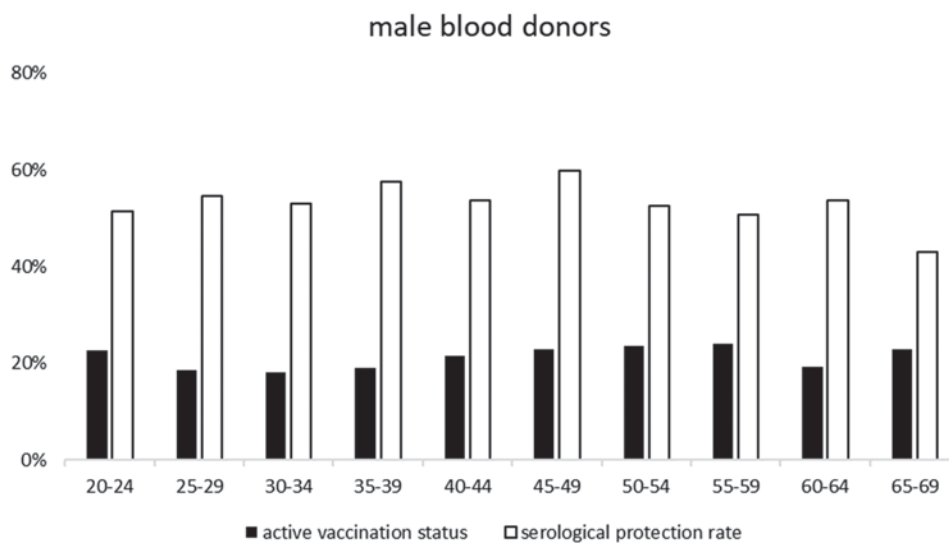
mSNA—see Table 1 for an overview. From these 1244 samples, which have been confirmed by mSNA as anti-TBEV specific, 126 sera were matched to age distribution and then were titrated in detail for further statistical analysis. Compared to the published data on the vaccination status of the RKI and health insurers, we saw a higher TBEV neutralizing seroprotection rate across all age groups and both genders. In detail, the survey data showed for males an average vaccination status of 21% and for females 23%, whereas our study found average TBEV-IgG protection rates for males of 52% and for females 57% (see Figures 1 and 2, and Tables S2 and S4). The protection rates were almost constant throughout all age groups; however, there was a small decline seen in the age group of 65–69 years. This reduction in the protection seems mainly to affect the female population of our study.

**Table 1.** Age and sex structure of the vaccinated donors.

Age-Group (Years)	TBEV-IgG Positive	TBEV-IgG Negative	TBEV-IgG Borderline	TBEV-IgG Positive or Borderline and NS1 Negative or Borderline and:		
				SNA Titer > 20 (Vaccinees)	SNA Titer ≤ 10	No IgG-Antibodies or NS1 pos. (no mSNA Performed)
18	70% (16/23)	30% (7/23)	0% (0/23)	65% (15/23)	0% (0/23)	35% (7/23)
19–24	64% (180/281)	33% (94/281)	2% (7/281)	58% (162/281)	0% (1/281)	42% (118/281)
25–29	63% (167/266)	34% (91/266)	3% (8/266)	57% (152/266)	1% (2/266)	42% (112/266)
30–34	58% (110/191)	39% (74/191)	4% (7/191)	55% (106/191)	1% (1/191)	44% (84/191)
35–39	60% (64/106)	35% (37/106)	5% (5/106)	58% (62/106)	0% (0/106)	41% (44/106)
40–44	63% (97/154)	29% (45/154)	8% (12/154)	60% (92/154)	5% (8/154)	35% (54/154)
45–49	58% (94/162)	35% (56/162)	7% (12/162)	58% (94/162)	2% (4/162)	40% (64/162)
50–54	56% (173/311)	40% (123/311)	5% (15/311)	51% (160/311)	3% (9/311)	55% (142/311)
55–59	48% (148/308)	44% (136/308)	8% (24/308)	50% (154/308)	2% (7/308)	48% (147/308)
60–64	56% (122/217)	39% (85/217)	5% (10/217)	57% (123/217)	1% (3/217)	42% (91/217)
>65	43% (86/201)	51% (103/201)	6% (12/201)	43% (87/201)	1% (2/201)	56% (112/201)
Total	57% 1257/2220	38% 851/2220	5% 112/2220	55% 1207/2220	2% 37/2220	43% 975/2220



**Figure 1.** shows the comparison of active vaccination status and serological protection rate found in our study—female blood donors.



**Figure 2.** shows the comparison of active vaccination status and serological protection rate found in our study—male blood donors.

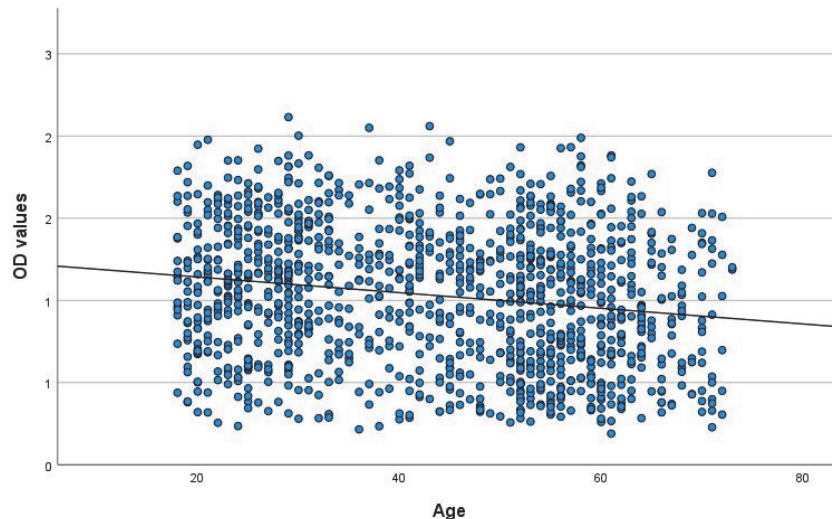
#### Optical density (OD) values, mSNA titers and age

For the linear regression analysis of OD values and mSNA titers, we used a subset of our data including 126 blood donors' samples, with detailed mSNA titers. There is a significant correlation between the OD values and mSNA titers: the  $R^2$  is 0.24, e.g., 24% of the variance of individual mSNA titers could be explained by our applied linear regression model. For this effect, the ANOVA test shows a  $p < 0.001$ . Using this subset ( $n = 126$ ) of blood donors for the comparison of mSNA titers and age, there was no significant correlation in the ANOVA test.



### Optical density (OD) values and age

We applied a linear regression model to investigate the relationship between age and OD values. The scatter diagram is shown in Figure 3. There is a declining trend in OD values with increasing age. The  $R^2$  is 0.03, e.g., only 3% of the variance of individual OD values could be explained by our applied linear regression model. For this effect, the ANOVA test shows a  $p < 0.001$ .



**Figure 3.** A linear regression model (line) was applied to analyse the relationship between OD values (scatter diagram) and age. There is a declining trend in OD values with increasing age.

### 4. Discussion

The German public health authorities recommend the TBEV vaccination for tick-exposed persons in so called “high risk regions (districts)” in Germany, as defined by the RKI (RKI, Epidemiologisches Bulletin, 9/2022). The basic immunization schedule for TBEV consists of three vaccine shots. The first booster is recommended after three years; further booster vaccinations are recommended after three or, respectively, five years, depending on the age group and the vaccine product. Despite these recommendations the number of human TBE cases has shown an increasing trend during the last years [17]. Therefore, the protection rate does not seem high enough in the German population at risk to decrease the number of human infections. In contrast to Austria, for Germany there are no exact data available on the TBEV protection rates. In Austria, since the introduction of the TBEV vaccine, the high field protection rates of >80% have decreased the numbers of notified human TBE cases by 80% [18,19].

For Germany, as well as for many other countries, only surrogate data on the assumed field protection rate against TBEV infections are available. In regular controls of the vaccination certificates of pupils in the Federal State of Baden-Württemberg, the RKI found a complete and up-to-date TBE vaccination course of about 27%. In the district Ortenaukreis the vaccination rate was reported to be below 30% (RKI, Epidemiological Bull., 48/2022). In a cross-sectional study on self-reported vaccine coverage, for the Federal State of Baden-Württemberg a vaccination rate of 37% was shown [12]. This seems to be in contrast to the results of Erber et al., where the vaccination rate in the age group <17 years was almost 50% while in the following age groups the vaccination rate decreased dramatically to only 20 to 30% [12]. These data may also show that the self-reporting of vaccination coverage may be misleading and the findings may be interpreted with caution.

All reported data on vaccination rates in the Federal State of Baden-Württemberg stand in contrast to our results. In our study sample, the mean TBEV-IgG protection rate of

all age groups is about 55%. Overall, female blood donors have slightly higher rates than the males, which is also in line with the findings from the RKI survey, where the difference in vaccination status was 21% for the male participants and 23% for female participants.

The main reason for the discrepancy is that the field protection rate (i.e., detection of neutralizing antibodies) might be different from the vaccination rate or active vaccination status (having the full vaccination course and boosters in time). It is well known that neutralizing antibodies may persist longer than the recommended booster intervals of five years or three years depending on age [20]. Schosser et al. found, in this context, sustained protective antibody titers in the group with three or more vaccine doses, even after formally prolonged time periods [20]. Titers were significantly higher in younger than in older vaccinees.

In the study of Erber et al., the second vaccination dose in the primary vaccination course (about four weeks after the first dose) was provided to about 80%, while the third dose (provided after 6 to 12 months) was applied only in about 60% of cases and boosters in only <30% of the participants [12]. These data fit well with the reported vaccination coverage, but may not reflect, therefore, the true field protection rate. We believe that our data are closer to the biological reality in the population than the surrogate active vaccination or vaccination coverage data.

The OD of the anti-TBEV-IgG ELISA (Euroimmun) is a parameter resembling the quantity of anti-TBEV antibodies in a serum sample. As we have confirmed previously, 98% (1223/1244) of the samples that tested positive in the anti-TBEV-IgG-ELISA could ultimately be confirmed for TBEV specific neutralizing antibodies via mSNA [9]. In conclusion, the anti-TBEV-IgG ELISA showed a very high sensitivity and specificity in our study. The presence of anti-TBEV-IgG antibodies in serum samples is linked to the presence of a sufficient neutralizing capacity for 98% of our samples, and there is a significant correlation between OD and mSNA titers. Therefore, the anti-TBEV-IgG ELISA might be a suitable epidemiological tool to indicate serological protection for TBEV and confirm vaccine protection to a high degree in regions where only TBEV is circulating, while in individual patients with a potential medical history of other flavivirus infections or vaccinations other assays for screening and confirmation of specific anti-TBE antibodies may be used. Our study, therefore, could show that this assay may be useful for epidemiological studies, although its use for the individual patient may be limited.

Assuming a much higher field protection rate as reported by surrogate data may also pose a different assessment of risk of infection to the population. Even if assuming that only about a quarter of the population is protected and about 75% are at risk, the true incidence might be much higher when about twice as many people within the population exhibit seroprotection against TBE infection. Assuming a seroprotection rate of >50%, the true incidence rate will double. Therefore, the risk of infection and human disease might be highly underestimated in regions with low vaccination protection (as calculated by public health services), but higher seroprotection rates.

Our study has several limitations. Our sample sizes vary for each age group and may be too small to be representative of the general population in the Ortenaukreis (Table S4). Furthermore, it must also be kept in mind that our samples come from blood donors, who usually belong to a very altruistic and health-conscious group that is in good physical shape, although no data exist to compare the TBEV vaccination rates in blood donors and the general population. Nevertheless, there might be some bias towards a higher vaccination and protection rate than exists in the non-blood donor population. The problem of persisting neutralizing antibodies over the period of booster recommendation has been discussed. At the moment, it is not clear if higher anti-TBEV neutralizing antibody titers also provide a longer lasting protection. Furthermore, data on the dynamics of the antibody decrease over time beyond the recommended booster intervals are not available. However, antibodies induced by an incomplete or irregular vaccination scheme may be sufficient for protection, at least in part, to those vaccinated. The assumption that it might not be necessary to follow the rather strict vaccination schedule for TBEV vaccination,

especially for TBEV vaccine boosters, in order to be protected against the disease underscores the quality/effectiveness of the two licensed and available TBEV vaccine products. As mentioned above, data show that >10% of anti-TBEV-IgG-positive blood donors in the Ortenaukreis show anti-TBEV-NS1-IgG [9]. We did not subtract the proportion of anti-TBEV-NS1-IgG positive samples from the total amount of anti-TBEV-IgG-positive blood donors. To date, it is not evident if TBEV vaccines induce a sterile immunity (or not) regarding anti-TBEV-NS1-IgG seroconversion. Moreover, there is the possibility that blood donors began their basic vaccination schedule after an (unknown/asymptomatic) TBEV infection, which would result in an anti-TBEV-IgG-positive and anti-TBEV-NS1-IgG positive status as well. This lack of clarity must be kept in mind when interpreting our dataset and deriving epidemiological conclusions.

Taken together, our study shows that serological studies on the prevalence rate of neutralizing antibodies provide more detailed data on the field protection rate than the available studies using different data sources and methods. These studies may underestimate the field protection rate in an area with low to moderate vaccination coverage. In our study, the ELISA assay for the detection of anti-TBE-IgG antibodies proved to be a good indicator for prevalence studies. Only a small percentage of positive reactions proved to be non-specific due to other flavivirus infections or vaccinations. This might, however, be due to the situation that, at the study site, only one single flavivirus is circulating. In this specific epidemiological setting with only one circulating flavivirus, the ELISA might be a suitable indicator for use in epidemiological studies. For an individual diagnosis, the potential cross reactions with other flaviviruses, e.g., after vaccinations, must be considered. The ELISA IgG ODs correlates with the neutralization titers, although it is, to date, not clear if higher titers lead to a longer duration or broader range of protection. The underestimation of the field protection rate may also lead to an underestimation of the infection risk and incidence of TBE in the non-immune population.

## 5. Conclusions

In Germany, data on the protection rate against TBEV in the population are not available. Surrogate data are obtained by control of vaccination certificates of first grade students, by billing documents of health insurances or by self-reporting studies. In the current study, the seroprotection rate in blood donors has been studied as measured in neutralization assay. The higher seroprotection rate found in contrast to the vaccination rates found in mentioned sources may be due to the specific population in our study, but also due to different assumptions made for the protection duration after vaccination and boosting. Our data also imply much higher TBEV infection rates in endemic risk areas. In an endemic situation with only one circulating flavivirus, the cross-reaction prone ELISA might be an efficient, cheap and easy-to-perform assay for studying the seroprotection rate in a population.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/vaccines11030522/s1>, Figure S1: Distribution of the 2104 blood-samples (aged 20–69) from Ortenaukreis in terms of sex and serological immune protection status; Table S1: Active vaccination status as evaluated by the RKI on the basis of primary care data; Table S2: Serological protection rate as evaluated from our study sample; Table S3: Comparison of the official vaccination rates vs. serological protection rates; Table S4: Numbers of percentages of serological protection rate in our study sample (samples confirmed serological protection/total number of samples).

**Author Contributions:** Conceptualization, G.D. and J.P.B.; methodology, K.E. and G.D.; formal analysis, K.E. and J.P.B.; investigation K.E. and G.D.; data curation, K.E., K.K. and J.P.B.; writing, K.E., G.D. and J.P.B.; supervision, G.D. and J.P.B.; project administration, G.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The study was partially funded by the grant from the Robert Koch Institute, Berlin, Germany, for the National TBE Consulting Laboratory. K.E. was funded in part by the German Ministry for Education and Research (part of the project TBENAGER, grant number 01KI2010A) and partially by a grant from Bavarian Nordic GmbH.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data are available by the authors on request.

**Acknowledgments:** We acknowledge the excellent laboratory assistance of Beate Oswald and Sabine Schaper.

**Conflicts of Interest:** J.B. received financial research support from Bavarian Nordic and Pfizer, as well as lecture and advisory board fees. G.D. received financial support from Pfizer Vaccines and Bavarian Nordic Vaccines for lectures and advisory board fees.

## References

1. Bogovic, P.; Strle, F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J. Clin. Cases* **2015**, *3*, 430–441. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Ruzek, D.; Avsic Zupanc, T.; Borde, J.; Chrdle, A.; Eyer, L.; Karganova, G.; Kholodilov, I.; Knap, N.; Kozlovskaya, L.; Matveev, A.; et al. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Res.* **2019**, *164*, 23–51. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Ecker, M.; Allison, S.L.; Meixner, T.; Heinz, F.X. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J. Gen. Virol.* **1999**, *80 Pt 1*, 179–185. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Kozlova, I.V.; Verkhovzina, M.M.; Demina, T.V.; Dzhoiev, Y.P.; Tkachev, S.E.; Karan, L.S.; Doroshchenko, E.K.; Lisak, O.V.; Suntsova, O.V.; Paramonov, A.I.; et al. Genetic and Biological Properties of Original TBEV Strains Group Circulating in Eastern Siberia. *Encephalitis* **2013**, *283*, 95–112.
5. Dai, X.; Shang, G.; Lu, S.; Yang, J.; Xu, J. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerg. Microbes Infect.* **2018**, *7*, 74. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Brockmann, S.O.; Oehme, R.; Buckenmaier, T.; Beer, M.; Jeffery-Smith, A.; Spannenkrebs, M.; Haag-Milz, S.; Wagner-Wiening, C.; Schlegel, C.; Fritz, J.; et al. A cluster of two human cases of tick-borne encephalitis (TBE) transmitted by unpasteurised goat milk and cheese in Germany, May 2016. *Eurosurveillance* **2018**, *23*, 17–00336. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Borde, J.P.; Zajkowska, J. Chapter 5: TBE in adults. In *Tick-Borne Encephalitis—The Book*; CreateSpace Independent Publishing Platform: Scotts Valley, CA, USA, 2021. [\[CrossRef\]](#)
8. Mickiene, A.; Laiskonis, A.; Gunther, G.; Vene, S.; Lundkvist, A.; Lindquist, L. Tickborne encephalitis in an area of high endemicity in Lithuania: Disease severity and long-term prognosis. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *35*, 650–658. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Euringer, K.; Grl, P.; Kaier, K.; Peilstöcker, J.; Schmidt, M.; Müller-Steinhardt, M.; Rauscher, B.; Bressau, E.; Kern, W.V.; Dobler, G.; et al. Tick-borne encephalitis virus IgG antibody surveillance: Vaccination- and infection-induced seroprevalence rates, south-western Germany. *Eurosurveillance* **2023**, *in press*.
10. Zent, O.; Jilg, W.; Plentz, A.; Schwarz, T.F.; Fruhwien, N.; Kuhr, H.B.; Banzhoff, A. Kinetics of the immune response after primary and booster immunization against tick-borne encephalitis (TBE) in adults using the rapid immunization schedule. *Vaccine* **2003**, *21*, 4655–4660. [\[CrossRef\]](#)
11. Harabacz, I.; Bock, H.; Jungst, C.; Klockmann, U.; Praus, M.; Weber, R. A randomized phase II study of a new tick-borne encephalitis vaccine using three different doses and two immunization regimens. *Vaccine* **1992**, *10*, 145–150. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Erber, W.; Schmitt, H.J. Self-reported tick-borne encephalitis (TBE) vaccination coverage in Europe: Results from a cross-sectional study. *Ticks Tick Borne Dis.* **2018**, *9*, 768–777. [\[CrossRef\]](#)
13. Grl, P.; Bestehorn-Willmann, M.; Zange, S.; Borde, J.P.; Dobler, G.; Buttlar, H.V. Tick-borne encephalitis virus (TBEV): Non-structural protein (NS1) IgG ELISA differentiating infection vs. vaccination antibody responses. *J. Clin. Microbiol.* **2020**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Albinsson, B.; Ronnberg, B.; Vene, S.; Lundkvist, A. Antibody responses to tick-borne encephalitis virus non-structural protein 1 and whole virus antigen—a new tool in the assessment of suspected vaccine failure patients. *Infect. Ecol. Epidemiol.* **2019**, *9*, 1696132. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Nygren, T. pers. Communication, Robert Koch Institute (RKI), Berlin, Germany.
16. Coroian, M.; Mihalca, A.D.; Dobler, G.; Euringer, K.; Grl, P.; Borsan, S.D.; Kalmar, Z.; Tincuta Briciu, V.; Flonta, M.; Topan, A.; et al. Seroprevalence Rates against West Nile, Usutu, and Tick-Borne Encephalitis Viruses in Blood-Donors from North-Western Romania. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 8182. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Kollaritsch, H.; Dobler, G.; Schmidt, A.J.; Krech, T.; Steffen, R. Tick-Borne Encephalitis (TBE)—Fundamentals. *Ther. Umsch.* **2022**, *79*, 463–470. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

18. Kunz, C. Vaccination against TBE in Austria: The success story continues. *Int. J. Med. Microbiol.* **2002**, *291* (Suppl. 33), 56–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Kunz, C. TBE vaccination and the Austrian experience. *Vaccine* **2003**, *21* (Suppl. 1), S50–S55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Schosser, R.; Reichert, A.; Mansmann, U.; Unger, B.; Heininger, U.; Kaiser, R. Irregular tick-borne encephalitis vaccination schedules: The effect of a single catch-up vaccination with FSME-IMMUN. A prospective non-interventional study. *Vaccine* **2014**, *32*, 2375–2381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## 4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es eine Seroprävalenzstudie für ein Risikogebiet in Baden-Württemberg mit einem neu etablierten ELISA durchzuführen. Dies war seit Einführung der Impfung in Deutschland nicht mehr möglich, da konventionelle ELISAs nicht zwischen Impf- und Infektionsantikörpern unterscheiden können. Außerdem wurden serologische Daten zum Anteil der gegen die FSME immunen Bevölkerung dieses Risikogebietes (Immunitätsrate) erhoben und mit den Impfquoten des RKI verglichen, die auf Abrechnungsdaten der gesetzlichen Krankenversicherungen basieren (RKI 2020). Basierend auf diesen Daten stellte das RKI außerdem Daten zu den Durchimpfungsraten für den Ortenaukreis zur Verfügung (NYGREN und BORDE 2022).

Die im Screening mit dem konventionellen Anti-FSME-IgG-ELISA ermittelte Seroprävalenz in den untersuchten Proben für Ortenaukreis liegt bei 57% (1257/2220). Von diesen 1257 Proben, die IgG Antikörper gegen das FSME-Virus aufwiesen, waren insgesamt 125 im NS1-ELISA positiv und wurden als Infizierte gewertet. Somit wies unsere gesamte Studienpopulation 5,6% (125/2220) Infizierte auf, wobei der verwendete NS1-ELISA die Infektionsantikörper rückwirkend über einen Zeitraum von 20 Jahren nachweist (GIRL et al. 2020). Umgerechnet entspricht dies einer Inzidenz von mehr als 250 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Die Inzidenz der offiziell gemeldeten Fälle hingegen beträgt lediglich 4,6 pro 100.000 Einwohner pro Jahr, somit deutet unsere Studie auf eine hohe Anzahl an stummen Infektionen hin. Diese Zahlen bestätigen einen Manifestationsindex der FSME von etwa 2%, der in der Literatur wiederzufinden ist (GUSTAFSON et al. 1992; KAISER 2008). Vermutlich verlaufen also 70-98% der FSME-Infektionen asymptomatisch. Beim Vergleich verschiedener Manifestations-Indices für die FSME muss die Definition eines FSME-Falls berücksichtigt werden, die nicht länderübergreifend vereinheitlicht ist (ECDC 2021).

Die Verwendung verschiedener serologischer Tests in unserer Studie bietet dabei einige Vorteile, da diese Tests verschiedene diagnostische Stärken aufweisen und sich untereinander ergänzen. Die so gewonnenen Daten geben Informationen über Anzahl und Art der Antikörper, die sich in den Spenderseren befinden: So kann anhand eines konventionellen IgG-ELISAs eine Aussage über die Quantität der Antikörper getroffen werden, während der NS1-ELISA und der SNT Informationen über die Art der Antikörper geben. Der IIFT wurde zur weiteren Differenzierung der Antikörper und zur

zusätzliche Überprüfung von Kreuzreaktionen durchgeführt. In unserer Studie wurden für 7 Proben anderweitige Flaviviren-Infektionen mit dem IIFT bestätigt; darunter 3 Proben, die Gelbfieber-Antikörper zeigten, 3 mit vorangegangener Dengue-Infektion und 1 Probe mit Antikörpern gegen Japanische Enzephalitis.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass trotz der gestiegenen Impfquoten in den letzten Jahrzehnten ein deutlicher Anstieg der FSME-Infektionsquote verzeichnet wurde: So stieg die Anti-FSME-IgG-Seroprävalenzrate im untersuchten Landkreis Ortenaukreis seit 1986 um ein Siebenfaches von 0,8% (ACKERMANN et al. 1986) auf 5,6%. Die gewählte Studienpopulation, die in unserer Studie aus Blutspendern besteht, hat dabei natürlich einen Einfluss auf die ermittelte Seroprävalenzrate. Generell variiert die Vergleichbarkeit von epidemiologischen Daten, die mithilfe von Blutspendern erhoben wurden, zu denen der Allgemeinbevölkerung in der Literatur und muss für jede Viruserkrankung gesondert beurteilt werden. So weisen Studien zum Vorkommen von chronischer Hepatitis B und C oder dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) beispielsweise darauf hin, dass die durch Blutspender erhobenen Daten nicht verallgemeinert werden sollten (GERMAIN et al. 2021; HOFSTRAAT et al. 2017; KUMBASAR KARAOSMANOGLU et al. 2011). Studien zu einer epidemisch vorkommenden Viruserkrankung wie etwa SARS-CoV-2 legen wiederum nahe, dass Studienpopulationen, die aus Blutspendern bestehen, für die Einschätzung der Seroprävalenz Ergebnisse liefern, die mit der Allgemeinpopulation durchaus vergleichbar sind (BUSCH et al. 2022; CASTRO DOPICO et al. 2021; GRANT et al. 2021).

Auch für das FSME-Virus variieren die Seroprävalenzraten von Blutspendern und Allgemeinbevölkerung in der Literatur. So fanden SKARPAAS et al. (2002) eine FSME-Seroprävalenzrate von 2,4% bei Einwohnern von Tromøy in Norwegen, während eine neuere Studie von MARVIK et al. (2021) die FSME-Seroprävalenz von norwegischen Blutspendern aus Vestfold und Telemark mit 0,4% angibt. In der Schweiz fanden MATILE et al. (1979) eine FSME-Seroprävalenzrate von 0,5-5% für die durchschnittliche Bevölkerung. Die durch vorangegangene FSME-Infektion verursachte Seroprävalenz für Blutspender wurde von ACKERMANN-GÄUMANN et al. (2023) für die Jahre 2014 und 2015 mit 5,6% beziffert.

Generell stellen Blutspender eine „Idealpopulation“ für epidemiologische Studien dar (O'BRIEN et al. 2022). Bei Rückschlüssen von mithilfe einer Blutspenderpopulation oder

anderen Probandengruppen erzielten Daten auf die Allgemeinbevölkerung müssen neben der Stichprobenmenge beispielsweise gesundheitliche oder infektionsepidemiologische und demographische Aspekte berücksichtigt werden. Die Impf- und Reisehistorie der Probanden, die akute endemische Situation oder die geographische Lage des beprobten Gebietes sind in der Auswertung ebenfalls zu berücksichtigen (LO et al. 2013; O'BRIEN et al. 2022; PIERRO et al. 2011; SLAVOV et al. 2020). Eine bessere Repräsentanz kann in einigen Fällen auch durch statistische Anpassung erzielt werden (O'BRIEN et al. 2022). Da die Studienpopulation in unserer Studie außerdem aus Probanden im Alter von 18 bis 72 Jahren besteht und bestimmte Altersgruppen stärker vertreten sind als andere (zum Beispiel die der 55-59-Jährigen), ist es naheliegend, dass diese nicht im Detail die Gesamtbevölkerung abbilden kann.

In einer Studie von OEHME et al. (2002), bei der das Blut ungeimpfter Waldarbeiter in Baden-Württemberg auf Anti-FSME Antikörper getestet wurde, wurde eine Seroprävalenzrate von 18% für den Ortenaukreis ermittelt. Dies verdeutlicht, dass sich das Expositionsrisiko für die FSME für bestimmte Bevölkerungsgruppen unterscheidet (Risikogruppen), und dies beim Betrachten der Ergebnisse ebenfalls berücksichtigt werden muss. Dies zeigt jedoch auch, inwiefern Seroprävalenzstudien nützlich für die FSME-Risikoabschätzung sein können und eine sinnvolle Ergänzung zur Inzidenz-basierten Risikobewertung der Gebiete darstellen könnten. Die Möglichkeit, aktiv und großflächig Gebiete zu beproben, sowie die Flexibilität in der Wahl der Gebiete und der Studienpopulationen (beispielsweise Risikogruppen vs. Allgemeinbevölkerung, verschiedene Altersgruppen, Touristen vs. Einheimische, Geimpfte vs. Ungeimpfte) stellen Vorteile der Seroprävalenzstudien gegenüber der rein Inzidenz-basierten Risikoerfassung dar. Außerdem spiegeln sich die gemeldeten klinischen Fallzahlen nicht notwendigerweise in der tatsächlichen (serologisch ermittelten) Anzahl der FSME-Infektionen wider (OEHME et al. 2002). Etwa 70-98% der FSME-Infektionen verlaufen asymptomatisch, und 30-50% der symptomatischen Fälle durchlaufen nur die erste Krankheitsphase (BORDE und ZAJKOWSKA 2019). Eine Meldung und Erfassung der Fälle erfolgt aber oft erst beim Auftreten neurologischer Symptome. Deshalb zeichnen die stummen Infektionen, die in serologischen Studien im Gegensatz zu den Inzidenz-basierten Meldestatistiken erfasst werden, ein viel präziseres Bild von der Dynamik des FSME-Infektionsgeschehens. Die Verbreitung des Virus kann somit viel vorausschauender und genauer erfasst werden, da eine Häufung von



Infektionsantikörpern in beispielsweise Blutspendersonen bemerkt werden kann, bevor die ersten klinischen Fälle manifest werden. So könnten frühzeitig entsprechende Informationen und Impfeempfehlungen mit der Bevölkerung geteilt werden.

Dies wird in Zukunft an Bedeutung gewinnen, da in Europa generell eine Zunahme der FSME beobachtet wird: Die Anzahl der Länder, die FSME-Fälle an die ECDC melden, stieg von 12 im Jahr 2000 auf 25 im Jahr 2019 (WONDIM et al. 2022). Auch wurde eine räumliche Ausbreitung der FSME innerhalb der Länder beobachtet, vor allem in nördlicheren Regionen (ANDERSEN et al. 2019; JAENSON et al. 2012b; TONTERI et al. 2015). In Deutschland gab es 2020 ein Rekordjahr für die FSME mit 712 gemeldeten Fällen (RKI 2022b).

Vermutlich spielt der Klimawandel eine entscheidende Rolle in dieser Entwicklung. Die kontinuierliche Erhöhung der Durchschnittstemperatur begünstigt milde Winter, die eine erhöhte Zeckenaktivität in untypischen Monaten zur Folge hat (GRAY et al. 2009; LINDGREN et al. 2000).

Neben den sich verändernden Witterungsverhältnissen werden andere Faktoren, wie die Anzahl der Wirte, Veränderung in der Flächennutzung und Landwirtschaft, sowie sozio-ökonomische Veränderungen der menschlichen Aktivität für die gestiegenen FSME-Fallzahlen verantwortlich gemacht (JAENSON et al. 2012a; RANDOLPH 2004).

Multifaktoriell bedingte Veränderungen in den Ökosystemen führen zu Veränderungen in den natürlichen Foci (RIZZOLI et al. 2009). Dies manifestiert sich beispielsweise in einer stärkeren Verbreitung und Vermehrungsrate der Reservoirtiere und damit wiederum in einer höheren Infektionsrate der Zecken (JAENSON et al. 2012a). Außerdem werden höhere Temperaturen mit höheren FSME-Infektionsraten der Zecken assoziiert, da höhere mikroklimatische Temperaturen die Replikationsrate des Virus beschleunigen (DANIEL et al. 2018).

Diese Daten zeigen, dass in Zukunft mit eher steigenden FSME-Zahlen gerechnet werden muss. Dennoch sind die offiziell erfassten Impfquoten in den Risikogebieten in Deutschland mit ca. 18% für Baden-Württemberg eher niedrig (RKI 2022b). In unserer Studie wurde für ca. 55% (1150/2104) der Proben ein neutralisierender Antikörpertiter gegen das FSME-Virus mithilfe des SNTs ermittelt. Dabei waren von den männlichen Probanden 52% und von den weiblichen Probanden 57% geimpft. Diese Zahlen sind signifikant höher als die vom RKI ermittelten Zahlen für den Ortenaukreis (im

Durchschnitt etwa 20%; dabei 21,14% für die Männer und 23,22% für die Frauen). Die etwas höhere Impfrate der Frauen in unserer Studie wie auch bei den Zahlen des RKI korreliert dabei mit Studien, die belegen, dass Frauen über ein höheres Risikobewusstsein für Zeckenstiche als Männer verfügen, öfter Schutzmaßnahmen gegen Zecken ergreifen und mehr über zeckenübertragene Krankheiten wissen als Männer (JEPSEN et al. 2019; SLUNGE et al. 2019; SLUNGE und BOMAN 2018). Die sehr viel höhere Impfrate unserer gesamten Studienpopulation könnte dem hohen Gesundheitsbewusstsein der Blutspender geschuldet sein. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass in den Zahlen des RKIs nur Personen zu den vollständig Geimpften gezählt wurden, die über eine vollständige FSME-Impfung und deren zeitgerechte Auffrischung unter Berücksichtigung der Dosenanzahl und der vergangenen Zeit seit der letzten Dosis verfügen (RKI 2020). Die signifikant höhere prozentuale Durchimpfungsrate unserer Studienpopulation könnte demnach auch für eine Langlebigkeit der Impfantikörper über den empfohlenen Impfplan hinaus sprechen. Studien, die sich bereits mit der Langlebigkeit von Impfantikörpern gegen die FSME auseinandergesetzt haben, bestätigen dies (STEFFEN et al. 2021). Folgestudien mit Fragebögen, die den aktuellen FSME-Impfstatus der Probanden erfassen, wären daher besonders interessant.

Diese Zahlen legen jedoch auch die Überlegung nahe, dass die wahre Inzidenz der FSME-Infektionen viel höher sein könnte, weil das Virus hier nicht auf eine naive Population trifft, sondern auf eine vermutlich zu 20 bis 55% immune Bevölkerung.

In jedem Fall scheinen die aktuell erzielten Impfquoten in Risikogebieten in Deutschland noch weit zu niedrig, um eine Steigerung der Fallzahlen wie im Jahr 2020 zu verhindern. Generell könnte eine verbesserte Aufklärung der Bevölkerung sowie die Empfehlung zur FSME-Impfung von Kindern den zukünftig steigenden Fallzahlen entgegenwirken. Ein gut dokumentiertes historisches Beispiel, dass die Effektivität flächendeckender Impfmaßnahmen im Zurückdrängen der FSME verdeutlicht, ist Österreich (KUNZ 2002).

Die Vorteile, die Seroprävalenzstudien in der Humanpopulation bieten, sind auch auf die Verwendung von Sentineltieren übertragbar. Sie bieten sogar einige Vorteile, denn da beim Menschen als Fehlwirt die Infektkette für das FSME-Virus endet, zeichnen Seroprävalenzstudien mit humanen Probanden eventuell ein unvollständiges Bild der FSME-Epidemiologie (DOBLER und TKACHEV 2019). Auch können bei der

Beprobung bestimmter Tierarten, zum Beispiel einiger Mausarten, Rückschlüsse auf das Vorhandensein eines Transmissionszyklus im jeweiligen Gebiet gezogen werden (DOBLER und TKACHEV 2019).

Prinzipiell eignen sich standorttreue Wildtiere wie Wühlmäuse, Rotfüchse oder Rehwild (ACHAZI et al. 2011; DUSCHER et al. 2015; HAUT et al. 2020; UCHIDA et al. 2018) sowie auch einige Haustierarten wie Wiederkäuer und Pferde (BAUER et al. 2021; IMHOFF et al. 2015; ŠIKUTOVÁ et al. 2009) als Sentinels für das FSME-Virus.

Der klinische Verlauf der FSME unterscheidet sich zwischen den Haustierarten. Während Hunde und Pferde nach einer Infektion Symptome entwickeln können, die denen des Menschen sehr ähneln, erkranken die Hauswiederkäuer nicht nach einer FSME-Infektion (CONZE et al. 2021; KLEEB et al. 2021; SALAT und RUZEK 2020). Auch Katzen scheinen für eine Erkrankung durch das FSME-Virus nicht empfänglich zu sein (ESCCAP 2023).

Hunde, für deren Population die FSME-Seroprävalenzrate in Deutschland 2,1 - 42,7% angegeben wird (BALLING et al. 2015; REINER et al. 2002) eignen sich nicht als Sentinel-Tiere für Infektionsherde, da sie mit der zugehörigen Familie zu mobil sind, um die Infektion einem bestimmten Ort zuweisen zu können (ROELANDT et al. 2011).

Die unbemerkte, weil asymptomatische Erkrankung der Wiederkäuer, die die FSME über die Rohmilch übertragen können, stellt ein nicht unerhebliches Risiko für die menschliche Gesundheit dar (GREŠÍKOVÁ et al. 1975; LIČKOVÁ et al. 2021). Dabei stellten Wiederkäuer sich bereits als geeignete Sentinels heraus, da ein Nachweis von FSME-Antikörpern in der Milch infizierter Tiere möglich ist (LEUTLOFF et al. 2006; WALLENHAMMAR et al. 2020).

Für Pferdeherden wurden FSME-Seroprävalenzraten von bis zu 30% in Bayern (KLAUS et al. 2013) und von 5,6% im östlichen Mitteldeutschland (GOTHE et al. 2023) ermittelt. Die potenzielle Impfung gegen das West-Nil-Virus (WNV) kann aufgrund der Kreuzreaktivität der durch die Flaviviren induzierten Antikörper die Möglichkeit, Pferde als Sentinels für die FSME zu beproben, verkomplizieren (GOTHE et al. 2023). Die Symptome sind bei Pferden nicht FSME-spezifisch. So muss bei Symptomen wie reduziertem Allgemeinbefinden, Fieber, Stupor, Ataxie, Störungen des Gangbildes an Differenzialdiagnosen wie eine Infektion mit dem West-Nil-Fieber (WNV), Hepatoenzephalopathien oder dem Borna-Virus gedacht werden (CONZE et al. 2021).

Das Risiko, sich in einem bestimmten Gebiet mit dem FSME-Virus zu infizieren, ist vom Vorkommen der natürlichen Foci in diesem Gebiet abhängig, in denen das Virus zirkuliert. Diese Foci sind oft sehr kleine Areale (CHITIMIA-DOBLER et al. 2019), und die Möglichkeit, über das Sammeln und Beprobieren von Zecken FSME-Risikogebiete einzugrenzen, hat sich in der Vergangenheit als ineffizient herausgestellt (STEFANOFF et al. 2013). Haustiere wie kleine Wiederkäuer, Rinder und Pferde werden räumlich begrenzt in Ställen und auf Weiden gehalten. Somit könnte die systematische serologische Beprobung von geeigneten Haustieren den Zugang zu den Foci, in denen das FSME-Virus zirkuliert, erleichtern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Seroprävalenzstudien mit Blutproben aus FSME-Risikogebieten, entweder von Menschen oder von Tieren, sehr erfolgversprechend sind, wenn es darum geht, das FSME-Risiko kalkulieren zu können, neue Herde ausfindig zu machen und die sich verändernden FSME-Dynamiken im Blick zu behalten. Dies gewinnt in Zukunft umso mehr an Bedeutung, da mit einer Verbreitung der FSME und mit einer Zunahme der FSME-Fälle gerechnet werden muss. Dabei können tierische Sentinels sowie die serologische Testung von Blutproben eine sinnvolle Ergänzung zur Inzidenz-basierten Risikobewertung sein. Seroprävalenzstudien verschaffen Zugang zur Anzahl der asymptomatischen Infektionsverläufe, die in den Meldestatistiken nicht erscheinen und zeichnen deshalb ein besonders präzises Bild der tatsächlichen Inzidenzrate und der Ausbreitungstendenz der FSME. Auch serologische Studien zur vorhandenen Immunität gegen die FSME in der Bevölkerung können dabei helfen, das FSME-Risiko besser einzuschätzen und gegebenenfalls gezielte Impfeempfehlungen an die Bevölkerung auszusprechen. Diese Arbeit verdeutlicht, dass dies im Anbetracht der steigenden FSME-Fallzahlen und der Ausbreitungstendenz des Virus zukünftig weiter an Bedeutung gewinnen wird.

## 5 Zusammenfassung

Kathrin Euringer

Untersuchung der Seroprävalenz von Impf- und Infektionsantikörpern gegen die Frühsommer-Meningoenzephalitis in einem Endemiegebiet in Süddeutschland

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht XX/XXXX

59 Seiten, 5 Abbildungen, 0 Tabellen, 131 Literaturangaben

Schlüsselwörter: FSME, Seroprävalenz, ELISA, NS1, SNT, Endemiegebiet, Baden-Württemberg, Ortenaukreis, Immunitätsrate

### Einleitung

Die FSME ist die medizinisch bedeutsamste zeckenübertragene Krankheit in Europa und Asien. In Europa erkranken jährlich mehrere tausend Menschen an der FSME. Zur Seroprävalenz der FSME liegen wenige Daten vor, da seit dem Aufkommen der FSME-Impfung in den 80er Jahren in Deutschland eine Unterscheidung von Impf- und Infektionsantikörpern mittels konventioneller serologischer Methoden nicht mehr möglich war. Die Entwicklung eines neuen ELISAs im Jahr 2020, der auf dem Nicht-Struktur Protein 1 (NS1) basiert, macht diese Unterscheidung möglich.

### Ziele der Arbeit

Die Ziele der durchgeführten Studie waren die Bestimmung von epidemiologischen Zielgrößen wie Seroprävalenz, Infektions- und Immunitätsrate sowie das Generieren neuer Daten zu Manifestationsindex im endemischen Landkreis Ortenaukreis in Baden-Württemberg. Das Vorliegen historischer Daten zur Seroprävalenz, die vor Einführung der Impfung im Landkreis Ortenaukreis erhoben wurden, schaffte zudem die interessante Möglichkeit, die Dynamik der FSME-Erkrankung in einem endemischen Gebiet über einige Jahrzehnte zu veranschaulichen. Des Weiteren wurden die Blutproben auf neutralisierende Antikörper hin untersucht, und die serologische Immunitätsrate der Proben mit vom Robert Koch-Institut bereitgestellten Zahlen zum Immunschutz in der Bevölkerung zu vergleichen.

### **Tiere, Material und Methoden**

Insgesamt wurden 2220 Blutspenderrestproben aus dem Landkreis Ortenaukreis in Baden-Württemberg beprobt. Die FSME-Meldezahlen wurden vom lokalen Gesundheitsamt bereitgestellt. Zuerst wurden alle Blutproben mit einem Anti-FSME-IgG-ELISA der Firma Euroimmun auf IgG-Antikörper gescreent. Alle im Screening positiven Proben wurden im weiteren Verlauf in dem neuen NS1-ELISA auf IgG-Antikörper gegen das NS1-Protein getestet. Alle im Screening-ELISA positiven und im NS1-ELISA negativen Proben wurden mittels mSNT auf das Vorhandensein neutralisierender Antikörper überprüft. Die auf Daten der Krankenversicherung basierende Impfquote für den Ortenaukreis wurde vom Robert Koch-Institut bereitgestellt.

### **Ergebnisse**

Von den 2220 Proben wiesen 57% (1257/2220) Anti-FSME-IgG Antikörper auf. 125 der 2220 Proben, also 5,6%, wurden mithilfe des NS1-ELISAs positiv auf eine vorangegangene FSME-Infektion getestet. Bei wenigen Proben wurden kreuzreagierende Antikörper gefunden, die durch andere Flaviviren induziert wurden (7/2220). Es konnte ein Manifestationsindex von ca. 2% ermittelt werden, sowie eine hohe Anzahl an stillen Infektionen von über 250 pro 100.000 Einwohnern pro Jahr. Für ca. 55% (1150/2104) der Proben wurden ein neutralisierender Antikörpertiter gegen das FSME-Virus ermittelt.

### **Schlussfolgerung**

In der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studien wurden neue Daten zu FSME-Inzidenz und Manifestationsindex in einem endemischen Gebiet generiert. Nach Vergleich mit Daten aus dem Jahr 1986 ist festzustellen, dass die Ergebnisse für einen etwa 7-fachen Anstieg der FSME-Infektionsraten im untersuchten Gebiet trotz der Verfügbarkeit eines hochwirksamen Impfstoffs sprechen. Die serologische Immunitätsrate ist signifikant höher als die vom Robert Koch-Institut für den Ortenaukreis erhobenen Zahlen zur Immunitätsrate (ca. 20%), was für eine längere Haltbarkeit der von der Impfung induzierten Antikörper sprechen könnte, als ursprünglich angenommen. Hier wären Folgestudien mit Fragebögen interessant, sodass mehr Daten über die Impfhistorie der Probanden vorliegen. Diese Arbeit verdeutlicht außerdem den Nutzen von Seroprävalenzstudien zur Ergänzung Inzidenz-basierter Risikobewertung von Gebieten, in denen das FSME-Virus endemisch ist.

## 6 Summary

Kathrin Euringer

Investigation of seroprevalence of vaccine- and infection-induced antibodies against Tick-borne Encephalitis in an endemic area in southern Germany

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted XX/XXXX

59 pages, 5 figures, 0 tables, 131 references

Keywords: TBEV, seroprevalence, ELISA, NS1, SNT, endemic area, Baden-Wuerttemberg, Ortenaukreis, serological protection rates

### Introduction

TBE is the medically most significant tick-borne disease in Europe and Asia. In Europe, several thousand people contract TBE every year. There is little data available on the seroprevalence of TBE, because since the availability of TBE vaccination in the 1980s in Germany, it has no longer been possible to distinguish between vaccine- and infection-induced antibodies using conventional serological methods. The development of a new ELISA in 2020 based on the non-structural protein 1 (NS1) makes this distinction possible.

### Objectives

The objectives of the study were to determine epidemiological target points such as seroprevalence, infection and serological protection rates and to generate new data on manifestation index in the endemic district of Ortenaukreis in Baden-Württemberg. The availability of historical seroprevalence data collected before the introduction of vaccination in the Ortenaukreis district also provided an interesting opportunity to illustrate the dynamics of TBE disease in an endemic area over several decades. Furthermore, the blood samples were analysed for neutralizing antibodies and the serological protection rate of the samples was compared with numbers provided by the Robert Koch-Institute on immune protection in the population.

### **Animals, Material and Methods**

A total of 2220 blood donor samples were sampled from the Ortenaukreis district in Baden-Württemberg. TBE reporting numbers were provided by the local health department. First, all blood samples were screened for IgG antibodies using an anti-TBE IgG ELISA from the company Euroimmun. All samples positive in the screening were subsequently tested for IgG antibodies against the NS1 protein in the new NS1 ELISA. All samples positive in the screening ELISA and negative in the NS1 ELISA were tested for the presence of neutralizing antibodies by mSNT. The vaccination rate for Ortenaukreis, based on health insurance data, was provided by the Robert Koch-Institute.

### **Results**

Of the 2220 samples, 57% (1257/2220) showed anti-TBE IgG antibodies. 125 of the 2220 samples, i.e. 5.6%, tested positive for a previous TBE infection using the NS1 ELISA. In a few samples, cross-reacting antibodies induced by other flaviviruses were found (7/2220). A manifestation index of about 2% could be determined, as well as a high number of silent infections of more than 250 per 100.000 inhabitants per year. A neutralizing antibody titer against the TBE virus was determined for ca. 55% (1150/2104) of the samples.

### **Conclusion**

In the studies on which this work is based, new data on TBE incidence and manifestation index were generated in an endemic area. After comparison with data from 1986, it can be stated that the results speak for an approximately 7-fold increase in TBE infection rates in the studied area despite the availability of a highly effective vaccine. The serological protection rate is significantly higher than the immune protection rate figures collected by the Robert Koch-Institute for the Ortenaukreis (approx. 20%), which could speak for a longer durability of the antibodies induced by the vaccination than originally assumed. Follow-up studies with questionnaires would be interesting here, so that more data on the vaccination history of the probands would be available. Furthermore, this study illustrates the use of seroprevalence studies in addition to incidence-based risk assessment of TBE endemic areas.



## 7 Referenzen

### 7.1 Literatur

Achazi K, Růzek D, Donoso-Mantke O, Schlegel M, Ali HS, Wenk M, et al. Rodents as sentinels for the prevalence of tick-borne encephalitis virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2011;11:641–7.

Ackermann R, Krüger K, Roggendorf M, Rehse-Küpper B, Mörtter M, Schneider M, et al. Die Verbreitung der Frühsommer-Meningoenzephalitis in der Bundesrepublik Deutschland. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 1986;111:927-933.

Ackermann-Gäumann R, Eyer C, Vock M, Gowland P, Tinguely C, Leib SL, et al. Prevalence of anti-tick-borne encephalitis virus (TBEV) antibodies in Swiss blood donors in 2014-2015. *Blood transfusion*. 2023;21:100–9.

Albinsson B, Rönnberg B, Vene S, Lundkvist Å. Antibody responses to tick-borne encephalitis virus non-structural protein 1 and whole virus antigen—a new tool in the assessment of suspected vaccine failure patients. *Infect Ecol Epidemiol*. 2019;9.

Albinsson B, Vene S, Rombo L, Blomberg J, Lundkvist Å, Rönnberg B. Distinction between serological responses following tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection vs vaccination, Sweden 2017. *Eurosurveillance*. 2018;23:17-00838.

Andersen NS, Larsen SL, Olesen CR, Stiasny K, Kolmos HJ, Jensen PM, et al. Continued expansion of tick-borne pathogens: Tick-borne encephalitis virus complex and *Anaplasma phagocytophilum* in Denmark. *Ticks Tick Borne Dis*. Januar 2019;10:115–23.

Apitzsch L, Sinnecker H, Wigand R, Berndt D. Tick-borne encephalitis virus isolation in the German Democratic Republic in 1965-66 and some strain-specific differences. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*. 1968;207:429-34.

Ashraf U, Ye J, Ruan X, Wan S, Zhu B, Cao S. Usutu virus: An emerging flavivirus in Europe. *Viruses*. MDPI AG; 2015;7:219–38.

Avirutnan P, Hauhart RE, Somnuk P, Blom AM, Diamond MS, Atkinson JP. Binding of Flavivirus Nonstructural Protein NS1 to C4b Binding Protein Modulates Complement Activation. *The Journal of Immunology*. 2011;187:424–33.

Balling A, Beer M, Gniel D, Pfeffer M. Prevalence of antibodies against Tick-Borne Encephalitis virus in dogs from Saxony, Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2015;128:297-303.

Balmaseda A, Stettler K, Medialdea-Carrera R, Collado D, Jin X, Zambrana JV, et al. Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114:8384–9.

Balmaseda A, Zambrana JV, Collado D, García N, Saborío S, Elizondo D, et al. Comparison of Four Serological Methods and Two Reverse Transcription-PCR Assays for Diagnosis and Surveillance of Zika Virus Infection. *J Clin Microbiol*. 2018;56.

## Referenzen

- Bauer BU, Könenkamp L, Stöter M, Wolf A, Ganter M, Steffen I, et al. Increasing awareness for tick-borne encephalitis virus using small ruminants as suitable sentinels: Preliminary observations. *One Health*. 2021;12:100227.
- Bogovic P. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J Clin Cases*. Baishideng Publishing Group Inc.; 2015;3.
- Bogovic P, Kastrin A, Lotric-Furlan S, Ogrinc K, Zupanc TA, Korva M, et al. Clinical and Laboratory Characteristics and Outcome of Illness Caused by Tick-Borne Encephalitis Virus without Central Nervous System Involvement. *Emerg Infect Dis*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2022;28:291–301.
- Borde JP, Zajkowska J. TBE in adults. In: Dobler G, Erber W, Bröker M, Schmitt H-J, Herausgeber. *The TBE Book*. 2. Aufl. Singapore: Global Health Press; 2019. S. 105–24.
- Brockmann SO, Oehme R, Buckenmaier T, Beer M, Jeffery-Smith A, Spannenkrebs M, et al. A cluster of two human cases of tick-borne encephalitis (TBE) transmitted by unpasteurised goat milk and cheese in Germany, May 2016. *Eurosurveillance*. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC); 2018;23.
- Busch MP, Stramer SL, Stone M, Yu EA, Grebe E, Notari E, et al. Population-Weighted Seroprevalence From Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection, Vaccination, and Hybrid Immunity Among US Blood Donations From January to December 2021. *Clinical Infectious Diseases*. 2022;75.
- Castro Dopico X, Muschiol S, Christian M, Hanke L, Sheward DJ, Grinberg NF, et al. Seropositivity in blood donors and pregnant women during the first year of SARS-CoV-2 transmission in Stockholm, Sweden. *J Intern Med*. 2021;290:666–76.
- Chan KR, Ismail AA, Thergarajan G, Raju CS, Yam HC, Rishya M, et al. Serological cross-reactivity among common flaviviruses. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12.
- Chitimia-Dobler L, Mackenstedt U, Kahl O, Petney TN. Transmission / Natural cycle. In: Dobler G, Erber W, Bröker M, Schmitt H-J, Herausgeber. *The TBE Book*. 2. Aufl. Singapore: Global Health Press; 2019. S. 62–86.
- Conze TM, Bagó Z, Revilla-Fernández S, Schlegel J, Goehring LS, Matiassek K. Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV) Infection in two Horses. *Viruses*. 2021;13:1775.
- Crill WD, Chang G-JJ. Localization and Characterization of Flavivirus Envelope Glycoprotein Cross-Reactive Epitopes. *J Virol*. 2004;78:13975–86.
- Dai X, Shang G, Lu S, Yang J, Xu J. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerg Microbes Infect*. 2018;7:1–9.
- Daniel M, Danielová V, Fialová A, Malý M, Kříž B, Nuttall PA. Increased relative risk of tick-borne encephalitis in warmer weather. *Front Cell Infect Microbiol*. Frontiers Media S.A.; 2018;8:90.
- Dobler G. Zoonotic tick-borne flaviviruses. *Vet Microbiol*. 2010;140:221–8.
- Dobler G. Diagnosis. In: Dobler G, Erber W, Bröker M, Schmitt H-J, Herausgeber. *The TBE Book*. 2. Aufl. Singapore: Global Health Press; 2019. S. 181–91.

## Referenzen

- Dobler G. Update zur Frühsommer- Meningoenzephalitis. *MMW Fortschr Med.* 2020;162:40–3.
- Dobler G, Gniel D, Petermann R, Pfeffer M. Epidemiology and distribution of tick-borne encephalitis. *Wiener Medizinische Wochenschrift.* 2012;162:230–8.
- Dobler G, Tkachev S. General epidemiology of TBE. In: Dobler G, Erber W, Bröker M, Schmitt H-J, Herausgeber. *The TBE Book.* 2. Aufl. Singapore: Global Health Press; 2019. S. 192–211.
- Duscher GG, Wetscher M, Baumgartner R, Walder G. Roe deer sera used for TBE surveillance in Austria. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015;6:489–93.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Epidemiological situation of tick-borne encephalitis in the European Union and European Free Trade Association countries. Stockholm; 2012a.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Second expert consultation on tick-borne diseases with emphasis on Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis. Stockholm; 2012b Apr.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Tick-borne encephalitis. In: *Annual Epidemiological Report for 2019.* Stockholm; 2021.
- European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (ESCCAP). Control of Vector-Borne Diseases in Dogs and Cats. ESCCAP Guideline 05 Fourth Edition - January 2023. 2023;37.
- Füzik T, Formanová P, Růžek D, Yoshii K, Niedrig M, Plevka P. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody. *Nat Commun.* 2018;9:436.
- Germain M, Grégoire Y, Custer BS, Goldman M, Bravo M, Kamel H, et al. An international comparison of HIV prevalence and incidence in blood donors and general population: a BEST Collaborative study. *Vox Sang.* 2021;116:1084–93.
- GirI P, Bestehorn-Willmann M, Zange S, Borde JP, Dobler G, von Buttlar H. Tick-Borne Encephalitis Virus Nonstructural Protein 1 IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Differentiating Infection versus Vaccination Antibody Responses. *J Clin Microbiol.* 2020;58.
- Gothel LMR, Ganzenberg S, Ziegler U, Obiegala A, Lohmann KL, Sieg M, et al. Horses as Sentinels for the Circulation of Flaviviruses in Eastern–Central Germany. *Viruses.* 2023;15:1108.
- Gould E, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. *The Lancet.* 2008;371:500–9.
- Grant R, Dub T, Andrianou X, Nohynek H, Wilder-Smith A, Pezzotti P, et al. SARS-CoV-2 population-based seroprevalence studies in Europe: a scoping review. *BMJ Open.* 2021;11.

## Referenzen

- Gray JS, Dautel H, Estrada-Peña A, Kahl O, Lindgren E. Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. *Interdiscip Perspect Infect Dis. Hindawi Limited*; 2009;2009:1–12.
- Grešíková M, Sekeyová M, Stúpalová S, Nečas S. Sheep Milk-Borne Epidemic of Tick-Borne Encephalitis in Slovakia. *Intervirology*. 1975;5:57–61.
- Gustafson R, Svenungsson B, Forsgren M, Gardulf A, Granström M. Two-year survey of the incidence of lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in a high-risk population in Sweden. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 1992;11:894–900.
- Haut M, Gírl P, Oswald B, Romig T, Obiegala A, Dobler G, et al. The red fox (*Vulpes vulpes*) as sentinel for tick-borne encephalitis virus in endemic and non-endemic areas. *Microorganisms*. MDPI AG; 2020;8:1–13.
- Heinz F, Herzig P, Asmera J, Benda R. Comparison of the sensitivity of complement fixation tests, virusneutralization tests and the indirect immunofluorescence methods in the serologic diagnosis of tick-borne encephalitis. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 1969;18.
- Heinz FX, Stiasny K, Holzmann H, Grgic-Vitek M, Kriz B, Essl A, et al. Vaccination and tick-borne encephalitis, central Europe. *Emerg Infect Dis*. 2013;19:69–76.
- Hofmann H, Heinz F, Dippe H. ELISA for IgM and IgG antibodies against tick-borne encephalitis virus: quantification and standardization of results. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A Med Mikrobiol Infekt Parasitol*. 1983;255:488-55.
- Hofstraat SHI, Falla AM, Duffell EF, Hahné SJM, Amato-Gauci AJ, Veldhuijzen IK, et al. Current prevalence of chronic hepatitis B and C virus infection in the general population, blood donors and pregnant women in the EU/EEA: a systematic review. *Epidemiol Infect*. 2017;145.
- Holzmann H. Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine*. Elsevier BV; 1. April 2003;21(SUPPL. 1):S36–40.
- Imhoff M, Hagedorn P, Schulze Y, Hellenbrand W, Pfeffer M, Niedrig M. Review: Sentinels of tick-borne encephalitis risk. *Ticks Tick Borne Dis*. 2015;6:592–600.
- Jaenson TGT, Hjertqvist M, Bergström T, Lundkvist Å. Why is tick-borne encephalitis increasing? A review of the key factors causing the increasing incidence of human TBE in Sweden. *Parasit Vectors*. 2012a;5.
- Jaenson TGT, Jaenson DGE, Eisen L, Petersson E, Lindgren E. Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the past 30 years in Sweden. *Parasit Vectors*. 2012b;5.
- Jepsen MT, Jokelainen P, Jore S, Boman A, Slunge D, Krogfelt KA. Protective practices against tick bites in Denmark, Norway and Sweden: a questionnaire-based study. *BMC Public Health*. 2019;19:1344.
- Kaiser R. Tick-borne encephalitis in Southwestern Germany. *Infection*. 1996;24:398–9.

## Referenzen

- Kaiser R. The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98 A prospective study of 656 patients. *Brain*. 1999.
- Kaiser R. Tick-Borne Encephalitis. *Infect Dis Clin North Am*. 2008;22:561–75.
- Kaiser R. Frühsommermeningoenzephalitis. *Nervenarzt*. Springer Verlag; 2016;87:667–80.
- Kaiser R, Vollmer H, Schmidtke K, Rauer S, Berger W, Gores D. Verlauf und Prognose der FSME. *Nervenarzt*. 1997;68:324–30.
- Kampen H, Holicki CM, Ziegler U, Groschup MH, Tews BA, Werner D. West Nile virus mosquito vectors (Diptera: Culicidae) in Germany. *Viruses*. MDPI AG; 2020;12.
- Klaus C, Hörügel U, Hoffmann B, Beer M. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection in horses: Clinical and laboratory findings and epidemiological investigations. *Vet Microbiol*. 2013;163:368–72.
- Kleeb C, Golini L, Beckmann K, Torgerson P, Steffen F. Canine Tick-Borne Encephalitis: Clinical Features, Survival Rate and Neurological Sequelae: A Retrospective Study of 54 Cases (1999–2016). *Front Vet Sci*. 2021;8.
- Kovalev SY, Mukhacheva TA. Reconsidering the classification of tick-borne encephalitis virus within the Siberian subtype gives new insights into its evolutionary history. *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier B.V.; 2017;55:159–65.
- Kumbasar Karaosmanoglu H, Altuntas Aydin O, Sandikci S, Yamanlar ER, Nazlican O. Seroprevalence of hepatitis B: Do blood donors represent the general population? *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2011;6:181–3.
- Kuno G, Chang G-JJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the Genus Flavivirus. *J Virol*. 1998;72:73–83.
- Kunz C. Vaccination against TBE in Austria: The success story continues. *International Journal of Medical Microbiology*. 2002;291:56–7.
- Labuda M, Kozuch O, Zuffová E, Elecková E, Hails RS, Nuttall PA. Tick-Borne Encephalitis Virus Transmission between Ticks Cofeeding on Specific Immune Natural Rodent Hosts. *Virology*. 1997;235:138–43.
- Lehrer AT, Holbrook MR. Tick-borne Encephalitis Vaccines. *J Bioterror Biodef*. 2011;01.
- Leutloff R, Nübling M, Neumann-Haeflin D, Rieger MA. Cows as indicators for tick-borne encephalitis (TBE) endemic regions: suitability of testing for antibodies in serum and milk. *International Journal of Medical Microbiology*. 2006;296:87–8.
- Ličková M, Fumačová Havlíková S, Sláviková M, Klempa B. Alimentary Infections by Tick-Borne Encephalitis Virus. *Viruses*. 2021;14:56.
- Lin A V. Indirect ELISA. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2015;1318:51–9.

## Referenzen

- Lindgren E, Tälleklint L, Polfeldt T. Impact of Climatic Change on the Northern Latitude Limit and Population Density of the Disease-Transmitting European Tick *Ixodes ricinus*. *Environ Health Perspect.* 2000;108.
- Litvin V lu, Korenberg E I. Natural foci of diseases: the development of the concept at the close of the century. *Parazitologiya.* Mai 1999;33.
- Litzba N, Zelená H, Kreil TR, Niklasson B, Kühlmann-Rabens I, Remoli ME, et al. Evaluation of different serological diagnostic methods for tick-borne encephalitis virus: Enzyme-linked immunosorbent, immunofluorescence, and neutralization assay. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 2014;14:149–59.
- Lo CL, Yip SP, Leung PH. Seroprevalence of dengue in the general population of Hong Kong. *Tropical Medicine & International Health.* 2013;18:1097–102.
- Mansfield KL, Horton DL, Johnson N, Li L, Barrett ADT, Smith DJ, et al. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. *Journal of General Virology.* 2011;92:2821–9.
- Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, Stephenson JR, Fooks AR, Solomon T. Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis. *Journal of General Virology.* 2009;90:1781–94.
- Marvik Å, Tveten Y, Pedersen A-B, Stiasny K, Andreassen ÅK, Grude N. Low prevalence of tick-borne encephalitis virus antibodies in Norwegian blood donors. *Infect Dis.* 2021;53:44–51.
- Matile H, Aeschlimann A, R W. Seroepidemiological investigations on the incidence of TBE in man and dog in Switzerland. In: Kunz E, Herausgeber. *Tick-borne encephalitis.* Baden/Vienna: Facultas Verlag Wien; 1979.
- Nygren T, Borde JP. Personal Communication. 2022.
- Nygren TM, Pilic A, Böhmer MM, Wagner-Wiening C, Wichmann O, Harder T, et al. Tick-borne encephalitis vaccine effectiveness and barriers to vaccination in Germany. *Sci Rep. Nature Research;* 2022;12.
- O'Brien SF, Drews SJ, Lewin A, Russell A, Davison K, Goldman M. How do we decide how representative our donors are for public health surveillance? *Transfusion (Paris).* 2022;62:2431–7.
- Oehme R, Hartelt K, Backe H, Brockmann S, Kimmig P. Foci of tick-borne diseases in Southwest Germany. *International Journal of Medical Microbiology.* 2002;291:22–9.
- Pfeffer M, Dobler G. Tick-borne encephalitis virus in dogs - is this an issue? *Parasit Vectors.* 2011;4:59.
- Pierro A, Gaibani P, Manisera C, Dirani G, Rossini G, Cavrini F, et al. Seroprevalence of West Nile Virus-Specific Antibodies in a Cohort of Blood Donors in Northeastern Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 2011;11:1605–7.
- Randolph SE. Evidence that climate change has caused 'emergence' of tick-borne diseases in Europe? *International Journal of Medical Microbiology Supplements.* 2004;293:5–15.

## Referenzen

- Randolph SE. Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda's enduring paradigm. *Ticks Tick Borne Dis.* 2011;2:179–82.
- Rastogi M, Sharma N, Singh SK. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virol J.* 2016;13:131.
- Rathore APS, St. John AL. Cross-Reactive Immunity Among Flaviviruses. *Front Immunol.* 2020;11.
- Reiner B, Grasmück S, Steffen F, Djuric N, Schindler T, Müller W, et al. Prevalence of TBE antibodies in serum and CSF of dogs with inflammatory and non-inflammatory CNS disease. *International Journal of Medical Microbiology.* 2002;291:234.
- Riccardi N, Antonello RM, Luzzati R, Zajkowska J, Di Bella S, Giacobbe DR. Tick-borne encephalitis in Europe: a brief update on epidemiology, diagnosis, prevention, and treatment. *Eur J Intern Med.* Elsevier B.V.; 2019;62:1–6.
- Rizzoli A, Hauffe HC, Tagliapietra V, Neteler M, Rosà R. Forest structure and roe deer abundance predict Tick-borne encephalitis risk in Italy. *PLoS One.* 2009;4.
- Robert Koch-Institut (RKI). FSME: Risikogebiete in Deutschland (Stand: Mai 2013). *Epidemiologisches Bulletin* 18/2013. 2013.
- Robert Koch-Institut (RKI). Chronologie der Impfeempfehlungen in Deutschland: Impfeempfehlungen im Überblick (Stand 13.12.2018). 2018.
- Robert Koch-Institut (RKI). Falldefinitionen des Robert Koch-Instituts zur Übermittlung von Erkrankungs- oder Todesfällen und Nachweisen von Krankheitserregern (Stand 01.01.2019). 2019.
- Robert Koch-Institut (RKI). Impfquoten bei Erwachsenen in Deutschland, STIKO: Bestätigung der Pneumokokken-Impfeempfehlung. *Epidemiologisches Bulletin* 47/2020. 2020.
- Robert Koch-Institut (RKI). SurvStat@RKI 2.0 [Internet]. 2022a [zitiert 16. September 2022]. Verfügbar unter: [survstat.rki.de](https://survstat.rki.de)
- Robert Koch-Institut (RKI). FSME-Risikogebiete in Deutschland (Stand: Januar 2022). *Epidemiologisches Bulletin* 9/2022. 2022b.
- Roelandt S, Heyman P, De Filette M, Vene S, Van der Stede Y, Caij AB, et al. Tick-Borne Encephalitis Virus Seropositive Dog Detected in Belgium: Screening of the Canine Population as Sentinels for Public Health. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 2011;11:1371–6.
- Roggendorf M, Heinz F, Deinhardt F, Kunz C. Serological Diagnosis of Acute Tick-Borne Encephalitis by Demonstration of Antibodies of the IgM Class. *J Med Virol.* 1981.
- Ruzek D, Avšič Županc T, Borde J, Chrdle A, Eyer L, Karganova G, et al. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Res.* Elsevier B.V.; 2019a;164:23–51.

## Referenzen

- Ruzek D, Kentaro Y, Marshall EB, Ernest AG. Virology. In: Dobler G, Erber W, Bröker M, Schmitt H-J, Herausgeber. The TBE Book. 2. Aufl. Singapore: Global Health Press; 2019b. S. 19–41.
- Salat J, Ruzek D. Tick-borne encephalitis in domestic animals. *Acta Virol.* 2020;64(02):226–32.
- Scheid W, Ackermann R, Bloedhorn H, Löser R, Leidtke G, Škrtić N. Untersuchungen über das Vorkommen der Zentraleuropäischen Enzephalitis in Süddeutschland. Untersuchungen zur Epidemiologie des Virus der Lymphocytären Choriomeningitis (LCM) in Westdeutschland. Wiesbaden: VS Verlag für Sozialwissenschaften; 1966;61–82.
- Schneider H. Über epidemische akute Meningitis serosa. *Wien Klin. Wschr.* 1931;350.
- Šikutová S, Hornok S, Hubálek Z, Doležalková I, Juřicová Z, Rudolf I. Serological survey of domestic animals for tick-borne encephalitis and Bhanja viruses in northeastern Hungary. *Vet Microbiol.* 2009;135:267–71.
- Sinnecker H. Zeckenenzephalitis in Deutschland. *Zbl. Bakt.* 1960;12–8.
- Skarpaas T, Sundøy A, Bruu A-L, Vene S, Pedersen J, Eng PG, et al. Tick-borne encephalitis in Norway. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2002;122:30–2.
- Slavov SN, Guaragna Machado RR, Ferreira AR, Soares CP, Araujo DB, Leal Oliveira DB, et al. Zika virus seroprevalence in blood donors from the Northeastern region of São Paulo State, Brazil, between 2015 and 2017. *Journal of Infection.* 2020;80:111–5.
- Slunge D, Boman A. Learning to live with ticks? The role of exposure and risk perceptions in protective behaviour against tick-borne diseases. *PLoS One.* 2018;13.
- Slunge D, Jore S, Krogfelt KA, Jepsen MT, Boman A. Who is afraid of ticks and tick-borne diseases? Results from a cross-sectional survey in Scandinavia. *BMC Public Health.* 2019;19:1666.
- Smorodintsev AA, Dubov A.V. Tick-borne encephalitis and prevention Tick-borne encephalitis and its vaccine prophylaxis. AMS USSR, Leningrad, „Medicine“. 1986;
- Sonnenberg K, Niedrig M, Steinhagen K, Rohwäder E, Meyer W, Schlumberger W, et al. State-of-the-art serological techniques for detection of antibodies against tick-borne encephalitis virus. *International Journal of Medical Microbiology Supplements.* 2004;293:148–51.
- Souza NCS e., Félix AC, de Paula AV, Levi JE, Pannuti CS, Romano CM. Evaluation of serological cross-reactivity between yellow fever and other flaviviruses. *International Journal of Infectious Diseases.* Elsevier B.V.; 2019;81:4–5.
- Stefanoff P, Pfeffer M, Hellenbrand W, Rogalska J, Rühle F, Makówka A, et al. Virus Detection in Questing Ticks is not a Sensitive Indicator for Risk Assessment of Tick-Borne Encephalitis in Humans. *Zoonoses Public Health.* 2013;60:215–26.



- Steffen R, Erber W, Schmitt H. Can the booster interval for the tick-borne encephalitis (TBE) vaccine 'FSME-IMMUN' be prolonged? - A systematic review. *Ticks Tick Borne Dis.* 2021;12:101779.
- Steinhagen K, Probst C, Radzimski C, Schmidt-Chanasit J, Emmerich P, van Esbroeck M, et al. Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016. *Eurosurveillance.* 2016;21.
- Stiasny K, Kiermayr S, Holzmann H, Heinz FX. Cryptic Properties of a Cluster of Dominant Flavivirus Cross-Reactive Antigenic Sites. *J Virol.* 2006;80:9557–68.
- Štibrániová I, Lahová M, Bartíková P. Immunomodulators in tick saliva and their benefits. *Acta Virol.* 2013;57:200–16.
- Süss J. Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-An overview. *Ticks Tick Borne Dis.* 2011;2:2–15.
- Süss J, Schrader C, Abel U, Bormane A, Duks A, Kalnina V. Characterization of tick-borne encephalitis (TBE) foci in Germany and Latvia (1997–2000). *International Journal of Medical Microbiology.* 2002;291:34–42.
- Süss J, Schrader C, Abel U, Voigt WP, Schosser R. Annual and seasonal variation of tick-borne encephalitis virus (TBEV) prevalence in ticks in selected hot spot areas in Germany using a nRT-PCR: Results from 1997 and 1998. *Zentralblatt für Bakteriologie.* 1999;289:564–78.
- Taba P, Schmutzhard E, Forsberg P, Lutsar I, Ljøstad U, Mygland, et al. EAN consensus review on prevention, diagnosis and management of tick-borne encephalitis. *Eur J Neurol.* Blackwell Publishing Ltd; 2017;24.
- Tonteri E, Kurkela S, Timonen S, Manni T, Vuorinen T, Kuusi M, et al. Surveillance of endemic foci of tick-borne encephalitis in Finland 1995–2013: evidence of emergence of new foci. *Eurosurveillance.* 2015;20.
- Uchida L, Hayasaka D, Ngwe Tun MM, Morita K, Muramatsu Y, Hagiwara K. Survey of tick-borne zoonotic viruses in wild deer in Hokkaido, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science.* Japanese Society of Veterinary Science; 2018;80:985–8.
- Valarcher JF, Hägglund S, Juremalm M, Blomqvist G, Renström L, Zohari S, et al. Tick-borne encephalitis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2015;34:453–66.
- Vene S, Haglund M, Lundkvist Å, Lindqvist L, Forsgren M. Study of the serological response after vaccination against tick-borne encephalitis in Sweden. *Vaccine.* 2007;25:366–72.
- Waldenström J, Lundkvist Å, Falk KI, Garpmo U, Bergström S, Lindegren G, et al. Migrating Birds and Tickborne Encephalitis Virus. *Emerg Infect Dis.* 2007;13.
- Wallenhammar A, Lindqvist R, Asghar N, Gunaltay S, Fredlund H, Davidsson Å, et al. Revealing new tick-borne encephalitis virus foci by screening antibodies in sheep milk. *Parasit Vectors.* BioMed Central Ltd.; 2020;13.

## Referenzen

Wondim MA, Czupryna P, Pancewicz S, Kruszevska E, Groth M, Moniuszko-Malinowska A. Epidemiological Trends of Trans-Boundary Tick-Borne Encephalitis in Europe, 2000–2019. Pathogens. MDPI; 2022.

World Organisation for Animal Health (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees), 7th ed. 2012.

### 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines reifen FSME-Virion (RUZEK et al. 2019b)	4
Abbildung 2: Die Replikation des FSME-Virus in der Wirtszelle (RUZEK et al. 2019a)	4
Abbildung 3: FSME-Risikogebiete 2022 in Deutschland (insgesamt 175), gefärbt nach Höhe der Inzidenz im Zeitraum von 2017-2021 (RKI 2022b).	7
Abbildung 4: Übertragungszyklus des FSME-Virus modifiziert nach PFEFFER und DOBLER (2011)	9
Abbildung 5: Klinischer Verlauf der FSME und Antikörperentwicklung nach DOBLER (2019)	13

## 8 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Mentor Gerhard Dobler ganz herzlich dafür bedanken, dass er mir diese Arbeit anvertraut hat. Durch seinen Enthusiasmus für seine Forschung konnte er mich nachhaltig für die Virologie und die Infektionsepidemiologie begeistern. Außerdem war er immer zur Stelle, wenn eine Literaturquelle einmal nicht auffindbar schien. Bei Martin Pfeffer, meinem Betreuer, bedanke ich mich sehr für die gute Betreuung, die hilfsbereite und geduldige Beantwortung meiner Fragen und die Korrektur dieser Arbeit. Johannes Borde danke ich sehr für die gute Zusammenarbeit beim Verfassen der Publikationen. Durch den Austausch und die zügige Revision der Paper konnte ich sehr viel lernen, was das Verfassen wissenschaftlicher Arbeiten angeht. Weiterhin möchte ich mich bei Lidia-Chitimia Dobler und Philipp Girl für die fachliche Unterstützung und die Einweisung in das Verfassen von Papern bedanken. Bei Lidia stand außerdem immer Nervennahrung in Form von Saft und Schokolade bereit.

Vielen lieben Dank an das ganze Team des Instituts für Mikrobiologie, sowie an Beate Oswald, Sabine Scharper und Max Pankla für die Unterstützung im Labor. An dieser Stelle sei auch meinen lieben Bürokolleginnen, den Essensgefährten und allen gedankt, die mich freundschaftlich und fachlich unterstützt und mir in zahlreichen Diskussionen wertvollen Input für meine Arbeit gegeben haben.

Ein großes Dankeschön gilt meiner Familie, die mich immer bedingungslos beim Erreichen meiner Ziele unterstützt und auf die ich immer zählen kann. Meinen lieben Freundinnen Sarah und Melli danke ich sehr für die seelische und moralische Unterstützung und dafür, dass ich mich immer an sie wenden kann, no matter what. Und last but not least danke ich meinem wunderbaren Freund, der mit seiner Klugheit und seiner guten Laune immer alles besser macht, mein Rückhalt ist, und in vielen (fachlichen) Gesprächen stets meinen Horizont erweitert.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name	Kathrin Euringer
Geburtsort	Mainburg
Geburtsdatum	21.02.1996

### **Werdegang**

2023 - heute	Junior Medical Manager, Vetoquinol GmbH, Ismaning
2021 - heute	Doktorandin an der Universität Leipzig Institut für Tierhygiene und öffentliches Veterinärwesen Betreuung: Prof. Dr. Martin Pfeffer
2021 – 2022	Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr Wissenschaftliche Mitarbeiterin unter der Leitung von OFA Prof. Dr. Gerhard Dobler
2020 – 2021	Zentrum für Kleintiermedizin Kelheim Praktische Tierärztin
2014 – 2020	Studium der Tiermedizin an der LMU München Erhalt der Approbation im April 2020
2006 – 2014	Apian-Gymnasium Ingolstadt Abitur

### **Publikationen**

**Euringer K**, Grl P, Kaier K, Peilstöcker J, Schmidt M, Müller-Steinhardt M, Rauscher B, Bressau E, Kern WV, Dobler G, Borde JP. Tick-borne encephalitis virus IgG antibody surveillance: vaccination- and infection-induced seroprevalences, south-western Germany, 2022. Euro Surveill. 2023 Mar 23; 28(12):2200408. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2023.28.12.2200408.

**Dobler G/Euringer K**, Kaier K, Borde JP. Serological Protection Rates against TBEV Infection in Blood Donors from a Highly Endemic Region in Southern Germany. Vaccines (Basel). 2023 Feb 23; 11(3):522. doi: 10.3390/vaccines11030522.

Coroian M, Mihalca AD, Dobler G, **Euringer K**, Grl P, Borşan SD, Kalmár Z, Tincuța Briciu V, Flonta M, Topan A, Rădulescu AL, Ungur A, Lupșe MS. Seroprevalence Rates against West Nile, Usutu, and Tick-Borne Encephalitis Viruses in Blood-Donors from North-Western Romania. Int J Environ Res Public Health. 2022 Jul 4; 19(13):8182. doi: 10.3390/ijerph19138182.

**Datum, Unterschrift**