

TICK-BORNE ENCEPHALITIS HOS HUND

EN OVERSET SYGDOM I DANMARK ?



HOVEDOPGAVE SOM FAGDYRLÆGE

OKTOBER 2005

HELLE BUSK

GENTOFTE DYREKLINIK

Sammendrag

Tick-borne encephalitis er en zoonotisk virussygdom, der i Europa overføres med flåten *Ixodes ricinus*.

Sygdommen er endemisk i store dele af Europa, men er i Danmark kun officielt registreret på Bornholm.

Det kunne derfor være fagligt interessant at forsøge at påvise, om Tick-borne encephalitis også var en sygdom, vi kunne forvente at se blandt vores hundepopulation i andre dele af Danmark.

Fra april-december 2004 indsendte dyrlæger, primært fra Storkøbenhavn og den østlige del af sjælland, serumprøver fra 29 hunde til Vet-Med-Labor i Tyskland til bestemmelse af antistoffer for Tick-borne encephalitis. Prøverne blev undersøgt ved en Complement-Fixations test. En titerværdi $<1:10$ blev anset for negativ.

Hovedsymptomerne hos hundene var høj feber, som ikke responderede på antibiotikabehandling, og akutte, neurologiske symptomer i vekslende grad.

En hund blev testet negativ, de resterende hunde havde en antistoftiter mellem $1:10$ – $1:160$.

8 hunde fik kontrolleret titerniveauet efter 2-3 uger, og her blev en serokonvertering konstateret hos de 7. En hund døde i det akutte forløb, og 2 hunde blev senere euthaniseret på grund af recidiv.

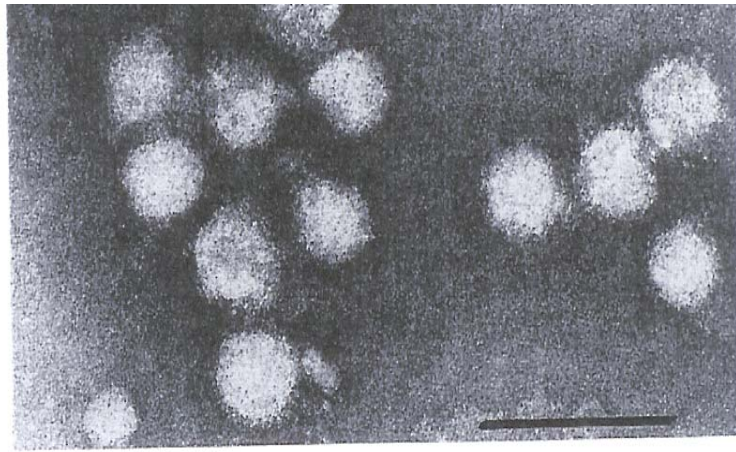
I perioden maj - august 2005 blev 35 hunde, tilfældigt udvalgt blandt Gentofte Dyrekliniks patienter, men uden kliniske symptomer på Tick-borne encephalitis, testet for Tick-borne encephalitis antistoffer hos Vet-Med-Labor.

20 hunde blev testet negative, mens 15 hunde havde en titer $\geq 1:10$ uden at frembyde symptomer på sygdommen. Kontroltitere efter 2-3 uger hos 6 hunde med en primær titer mellem $1:20$ – $1:80$ viste en serokonvertering hos alle 6.

Disse resultater kunne indikere, at hunde, også uden for Bornholm, blev eksponeret for agens og udviklede sygdommen Tick-borne encephalitis, mens andre alene fungerede som reservoir for virus.

Indledning

Tick-borne encephalitis (TBE) er en viral sygdom (zoonose), der skyldes et RNA-virus tilhørende genus *Flavivirus*, familie *Flaviviridae*.^{1,2,3}



Flaviviridae, genus *Flavivirus*, central European tick-borne encephalitis virus. Negative stain electron microscopy. Bar: 100 nm

Fig. 1: Elektronmikroskopi af Flavivirus.²

Genus *Flavivirus* kan inddeles i 3 hovedgrupper: Den mosquito-overførte, den flåt-overførte og den ukendt-vektor-overførte gruppe. Sidstnævnte gruppe nævnes kun i en enkelt reference og her inkluderes ingen sygdomme.⁴

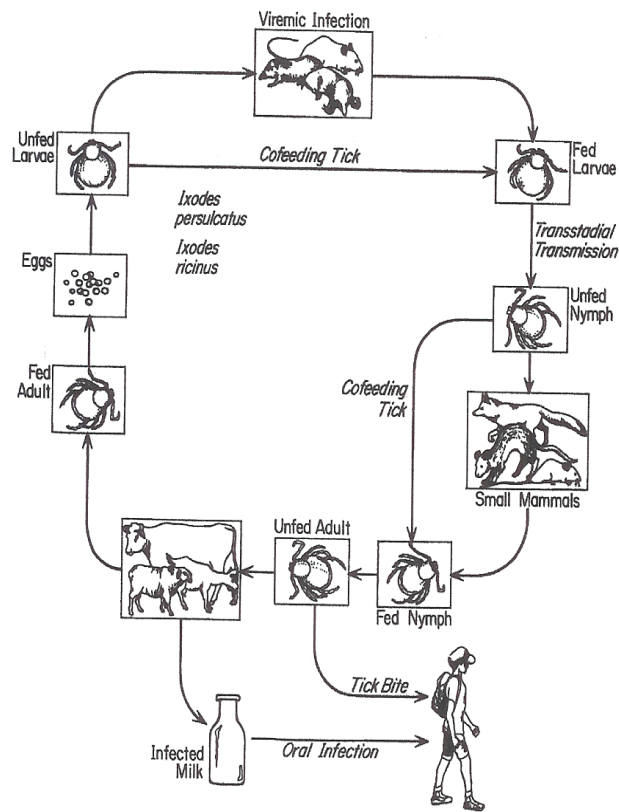
Det mosquito-overførte flavivirus inkluderer Japansk encephalitis virus, West Nile virus, Gul Feber virus og Dengue virus. Det flåt-overførte flavivirus omfatter TBE virus, Louping Ill virus, Langat virus, Powassan virus og Omsk hæmorrhagisk Feber virus.

TBE virus kan igen inddeles i 3 undergrupper: Den vesteuropæiske (prototype: Neudoerfl stamme), den fjernøstlige (prototype: Russian Spring Summer Encephalitis (RSSE) virus, Sofjin stamme) og den sibirske (prototype: Vasilchenko).^{4, 5}

I Vesteuropa overføres virus med flåten *Ixodes ricinus* (*I. ricinus*), der både fungerer som vektor og som vært for virus.^{2, 4, 5} *I. ricinus* naturlige værter er primært små gnavere, og da flåten har en flerårig udvikling, lever den ofte længere end sine værtsdyr.²

Andre naturlige værter er rådyr, ræve og fugle, men også husdyr (hunde, katte, får, kvæg) og mennesker kan fungere som værter.^{2, 3}

Inficerede flåter er bærere af virus hele livet uden selv at være afficerede. Virus overføres både ved transovariel transmission (fra generation til generation) og transstadial transmission (fra et udviklingsstadium til det næste)²



The transmission cycle of viruses of the tick-borne encephalitis complex showing hosts for larval, nymphal, and adult ticks. Virus is passed to succeeding tick stages during molting and is passed transovarially to progeny. Both male and female ticks are involved in transmission. [From T. P. Monath and F. X. Heinz, Flaviviruses. In "Fields Virology" (B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus, eds.), 3rd ed., pp. 961–1034. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, 1996.]

Figur 2: Transovariel og transstadial overførsel af virus hos flåter.²

TBE er en sæsonpræget sygdom afhængig af flåternes aktivitetsniveau. I Centraleuropa er den ofte bifasisk og toppe fra april-juni og igen fra september-oktober. I Nordeuropa er den monofasisk og toppe fra juni-september.^{6, 7}

Prævalensen af inficerede flåter ligger mellem 0,05 % i Italien og 40 % i dele af det tidligere Rusland.⁸ En undersøgelse af prævalensen af inficerede flåter i dele af Tyskland viste, over en periode på 3 år, en prævalens for voksne flåter mellem 0-5,8 % og for nymfer mellem 0,1-3,4 %.⁹ At prævalensen var højere blandt voksne flåter end hos nymfer var forventelig, da den voksne flåt havde fået to ”blodige” måltider mod nymfens ene.⁹

Sygdommen, der er endemisk i størstedelen af Europa, har siden 1931 været kendt som årsag til infektiøse sygdomme i det centralnervøse system (CNS) hos mennesker, mens der frem til 1972 kun var beskrevet et enkelt tilfælde hos hund.^{7, 9, 10, 11}

Eksperimentelle forsøg, hvor hunde blev inficerede, enten med inficerede flåter eller med infektiøst agens givet subcutant, viste en positiv TBE antistof titer men ingen kliniske symptomer.¹²

Hunde blev derfor betragtet som værende relativ resistente overfor sygdommen, og det er først i de seneste år, at man inden for den veterinære verden er blevet opmærksom på TBE-virus infektioner som årsag til alvorlige, neurologiske sygdomme hos hunde.^{1, 3, 10}

TBE hos hund kan inddeles i 4 grupper.^{3,7}

1. Seropositive hunde, som sjældent eller aldrig udviser symptomer på sygdommen.
2. Perakutte forløb med dødelig udgang i løbet af 3-4 dage.
3. Akutte tilfælde, som klinger af over 1-3 uger uden recidiv.
4. Akutte tilfælde som bliver kroniske, ofte med recidiv af alvorlig, neurologisk karakter.

Inkubationstiden er 2-4 dage. Symptomerne er høj feber, som ikke responderer på antibiotikabehandling, alvorlige, neurologiske symptomer (eks.vis facialis parese, vestibulære symptomer, nystagmus, ataxi, tetraplegi, generaliserede krampeanfald m.m.), apati og anorexi.^{3,7}

Terapien er symptomatisk, og sygdommen kan være fatal i den akutte fase og give alvorlige, neurologiske bivirkninger i det kroniske forløb.¹

Indgangsvinklen til dette studie var en patient hos dyrlæge Kristine Elbæk.*

Hun fik en ung hund ind på klinikken med høj feber og lette neurologiske symptomer. I løbet af 2-3 dage udviklede symptomerne sig fatalt, og da hunden samtidig viste sig at være seropositiv for TBE, stemte både sygehistorie og en positiv titer overens med TBE tilfælde, beskrevet i litteraturen.^{1,3,10,11}

Officielt er TBE kun konstateret på Bornholm,¹³ men ovennævnte hund havde aldrig været uden for Gentofte, så tilstedeværelsen af inficerede flåter og dermed risikoen for at udvikle et klassisk udbrud af TBE måtte derfor også være til stede i andre dele af Danmark.

Det er et forsøg på at undersøge denne problemstilling, der ligger til grund for dette studie.

Materialer og metoder.

Materiale:

Fra april til december 2004 indsendte dyrlæger, primært fra Storkøbenhavn og den østlige del af Sjælland, blodprøver fra 29 hunde til Vet-Med-Labor (VML) i Tyskland.

Prøverne blev testet for TBE antistoffer ved en Complement-Fixations (CF) test. **(Bilag 1)**

Der er evidente journaloplysninger på 21 af de 29 hunde. = Gruppe A **(Bilag 2)**

Som kontrolgruppe blev 35, klinisk raske og tilfældigt udvalgte, hunde fra Gentofte Dyreklinik i perioden maj - august 2005 testet for TBE hos VML ved en CF-test. = Gruppe B **(Bilag 3)**

* Dyrlæge Kristine Elbæk, Dyreklinikken Artemis, 2900 Hellerup

Metode:

VML sender blodprøver, der skal testes for TBE, videre til et schweizisk laboratorium, Diavet. Diavet får sine reagenser til CF-testen fra et andet schweizisk laboratorium, Institute Virion, og testen udføres efter en arbejdsprotokol beskrevet af Lennette et al.^{14,15}
En oversigt over CF-testens principper og udførelse ses i bilag 4.¹⁶

Statistisk bearbejdning:

Studiet bestod initialt af to grupper af hunde, en med 29 syge hunde, testet for TBE ved en CF-test hos VML i 2004, og en kontrolgruppe på 35 klinisk raske hunde ligeledes testet for TBE ved en CF-test hos VML i 2005.

I den videre bearbejdning af materialet, blev 8 hunde i gruppen af syge dyr ekskluderet, da det ikke var muligt at få kendskab til de kliniske symptomer.

Antallet af syge dyr blev derfor reduceret til $n=21$.

Antallet af raske dyr var fortsat $n = 35$.

Disse værdier er anvendt til en beregning af den diagnostiske sensitivitet (Se) og specificitet (Sp).
Kriterium: En titer-værdi $<1:10$ betragtes som negativ.¹⁴

Den statistiske signifikans mellem de kliniske symptomer og CF-testen bestemmes ved en χ^2 -test, (McNemar's)¹⁷.

Odd Ratio (OR) beskriver, hvor tæt associerede de to test er.

Der blev udført en χ^2 -test (2x2 tabel) for at påvise en mulig signifikant sammenhæng mellem køn, alder og racedisposition.

Da der er < 200 dyr i undersøgelsen, blev Yates korrektion brugt på testene.¹⁸

Med hensyn til alder, var gennemsnitsalderen for samtlige dyr i undersøgelsen 6,1 år. Den værdi blev brugt til at opdele hundene i to grupper:

Gruppe 1: 0-6 år

Gruppe 2: >6 år.

Med hensyn til racer, var retrieverne bedst repræsenteret i begge grupper. Racerne er derfor delt op i følgende to grupper:

Gruppe 1: Retrievere.

Gruppe 2: Andre racer.

Grafiske illustrationer:

Et søjlediagram, til påvisning af fordelingen af klinisk syge hunde med en positiv TBE titer i forhold til årets måneder, blev udformet.

Resultater

Klinisk undersøgelse

Gruppe A:

Bestående af 21 hunde, hvor 18 hunde kom ind med symptomer på en akut neurologisk lidelse, karakteriseret ved høj feber (11/18) og neurologiske symptomer (15/18). De neurologiske symptomer kunne kategoriseres som ataxi (5/18), slingerhed (1/18), parese af for – og/eller bagben (9/18), facialis parese (1/18), lokale kramper i kæben (1/18) og universelle kramper (5/18). 5 hunde havde G-I symptomer, de 2 (hund nr. 12,13) som det primære symptom kombineret med træthed, sløvhed og hævede led, de resterende 3 som en del af det neurologiske sygdomskompleks. En enkelt hund (hund nr. 11) havde, som det eneste symptom, en halthed på det ene forben. En hund døde i det akutte forløb (hund nr. 16), 2 blev euthaniseret på grund af vedvarende recidiv af neurologisk karakter (hund nr. 1, 5). (Bilag 2)

Gruppe B:

Bestående af 35 hunde hvor den kliniske undersøgelse var upåfaldende.(Bilag 3)

Laboratorieundersøgelser

Gruppe A:

Alle hunde blev testet positive for TBE ved en CF-test. Titer værdien lå mellem 1: 10 – 1:160. 8 hunde blev kontroltestet for TBE efter 2-3 uger, og her viste 7 hunde en serokonvertering (= en ændring i titerværdien), mens den sidste hund havde samme titer værdi som ved første prøve. Den blev desværre ikke testet på et senere tidspunkt.

2 hunde fik udtaget cerebrospinalvæske (CSF) til undersøgelse. Begge prøver var uspecifikke mht. TBE, den ene viste mononukleære celler, den anden viste kun erythrocytter (artefact).

17 hunde blev testet for *Borrelia* antistoffer (VML), her var 1 positiv, men kontrol titer var negativ.

9 hunde blev testet for *Erlichia canis* antistoffer (VML), her var alle negative.

2 hunde blev testet for *Neospora canis* og begge var negative.

Gruppe B:

Alle 35 hunde blev testet for TBE ved en CF-test.

20 hunde blev testet negative (<1:10)

15 hunde blev testet positive med en titer værdi mellem 1:10 – 1:80. Heraf havde 9 hunde en titer værdi på 1:10.

6 hunde med en primær titer mellem 1:20 og 1:80 blev kontroltestet efter 2-3 uger, og alle 6 havde på det tidspunkt serokonverteret.

2 hunde blev testet positive for *Borrelia* antistoffer, kontrol titer var negativ.

1 hund blev testet negativ for *Erlichia canis*.

Andre undersøgelser

Hund nr.16 blev efterfølgende obduceret. Konklusion på obduktionen: De observerede forandringer tyder på en generaliseret bakterieinfektion. Der blev ikke fundet noget abnormt ved histologi af CNS.

Resultater af statistiske analyser.

Estimering af den diagnostiske Se og Sp

På baggrund af de positive og negative titer værdier ved CF-testen kunne Se og Sp beregnes til henholdsvis 0,72 og 0,57.

Bestemmelse af χ^2 (McNemar's) og OR blandt de to grupper af dyr.

$$\chi^2 = 14,06 \quad p < 0,001$$

Da χ^2 er $> 3,84$, viste testen en signifikant sammenhæng mellem de to korrelerede proportioner.

$$OR = 15$$

En OR på 15 viste, at der blandt de undersøgte dyr var 15 gange større sandsynlighed for, at hunden

havde en positiv titer i forhold til kliniske symptomer på sygdommen.

Bestemmelse af χ^2 (2x2 tabel) anvendt på bestemmelse af forskellen mellem to uafhængige proportioner.

Kønsfordeling:

Yates korrektion: $\chi^2 = 1,42$ $p = 0,23$

$\chi^2 < 3,84$ viste, at der ikke var signifikant forskel på kønnene.

Aldersfordeling:

Yates korrektion: $\chi^2 = 2,10$ $p = 0,15$

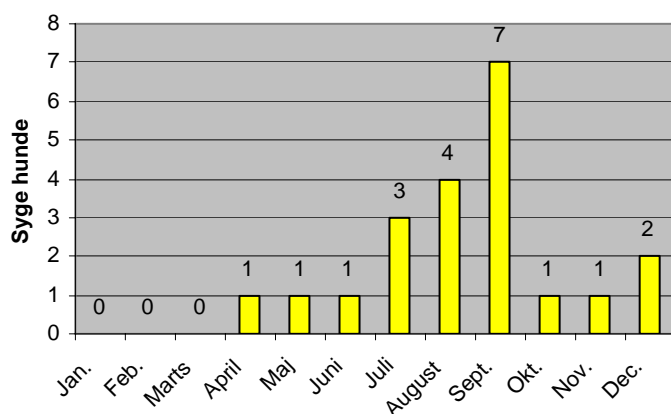
Værdien for χ^2 viste, at der ikke var signifikant forskel på aldersgrupperne.

Racedisposition:

Yates korrektion: $\chi^2 = 0,30$ $p = 0,59$

χ^2 viste, at der ikke var signifikant forskel på racerne.

Grafisk illustration:



Figur 3: Fordelingen af klinisk syge hunde med positiv TBE titer i forhold til årets måneder.

Diskussion

TBE i Danmark er indtil videre kun konstateret på Bornholm.¹³ I Sverige er TBE konstateret omkring Stockholm, men ”nye” områder i Sverige, bl.a. Skåne og Blekinge, har også rapporteret om humane tilfælde af TBE, og i store dele af Europa er sygdommen endemisk til stede.¹⁹

I 2004 blev 29 danske hunde testet for TBE. I undersøgelsen blev 21 hunde medtaget, og ud fra laboratoriesvaret kunne tidspunktet for udtagning af blodprøve konstateres. Fra litteraturen vides, at TBE i Nordeuropa er monofasisk og toppe fra juni-september.^{6, 7}

Figur 3 viste fordelingen af klinisk syge hunde med en positiv TBE titer på de enkelte måneder og stemte fint overens med resultater beskrevet i litteraturen.

Der er i litteraturen ikke påvist nogen disponering for TBE mht. alder, køn og/eller race,²⁰ og undersøgelsens resultater viste heller ikke noget sådant. Enkelte referencer nævner, at rottweiler er mere disponeret end andre racer, men dette er ikke verificeret.^{3, 21}

I undersøgelsen blev 8 hunde ekskluderet på grund af manglende journaloplysninger. I det resterende materiale havde en hund (nr. 19) været i Skåne på markprøve. (Mundtlig reference fra ejer.)*

Ud fra journaloplysninger på de resterende 21 hunde havde 18 hunde klassiske symptomer på TBE, og alle hundene havde en positiv titer for TBE antistoffer.

En enkelt titer er dog ikke tilstrækkelig til at stille diagnosen.¹⁴ Den skulle, om muligt, gentages efter 2-3 uger, men kombineret med de kliniske symptomer gav den et billede på, om diagnosen TBE var realistisk.

Der blev desværre kun foretaget en CSF analyse på to hunde, og begge analyser var af ringe validitet.

En CSF analyse vil oftest vise en moderat eleveret proteinkoncentration og mononukleær pleocytosis, foreneligt med en non-suppurativ encephalitis. Analysen er ikke specifik for TBE, men kan også ses ved andre sygdomme (hundesyge, rabies, Aujesky's syge, Ehrlichiose, Borreliose med flere), men kombineret med påvisning af antistoffer for TBE i CSF, kan den være en stor hjælp til at differentiere TBE fra andre årsager til en non-suppurativ encephalitis.¹⁰

* Dyrlæge Susanne Forchhammer, Stenløse Dyreklinik.

En CSF analyse på samtlige hunde i gruppe A ville derfor have været ønskelig, og burde være en fast del af det diagnostiske arbejde med henblik på TBE.

Ligeledes burde alle hundene i gruppe A have været testet for Borreliose og Erlichiose, og en mangel på dette samt en manglende CSF analyse kunne betragtes som en mulig fejlkilde.

En hund døde i det akutte forløb og blev efterfølgende obduceret. Her blev der ikke påvist forandringer i centralnervesystemet (CNS).

En mulighed kunne være, at hunden ikke døde af TBE. Det talte de kliniske symptomer, det korte og akutte sygdomsforløb samt en positiv titer imod.

En anden årsag til en manglende påvisning af forandringer kan være, at det kræver en mere følsom teknik at opdage de virale patogener¹ og endelig kan det skyldes, at kroppen allerede har fagociteret og elimineret antigen. Det sidste er også en væsentlig grund til, at der hurtigere kan måles antistoffer i CSF end i serum.¹

De resterende 3 hunde havde også en positiv titer men til gengæld mere uspecifikke symptomer, primært gastrointestinale, og et ikke så akut forløb.

Humant taler man om, at TBE har et bifasisk forløb. I initialfasen, som varer 2-8 dage, ses bl.a. gastrointestinale symptomer. Denne periode efterfølges af en asymptomatisk periode. 20-30 % af patienterne udvikler herefter neurologiske symptomer (anden fase), alternativt klinger sygdommen af. Ovenstående symptomer kan muligvis betragtes som det initiale stadie i et bifasisk forløb, hvor sygdommen klinger af inden anden fase.¹¹

Alle hundene i gruppe A og gruppe B blev testet for TBE antistoffer ved en CF-test, som er en konventionel serologisk test.²²

Se for testen blev beregnet til 0,72 og Sp til 0,57.

Det har ikke været muligt at fremskaffe Se og Sp værdier på den konkrete CF-test, som laboratoriet Diavet anvendte.

En tilgang til validering af testen findes i en artikel fra 2004: "Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison" hvor flere forskellige test sammenlignes.²² Her undersøges gennemsnittet for summen af Se og Sp værdier (= gennemsnitlig Performance Index (PI)) for de forskellige test, og højeste score er 200.

Gennemsnitlig PI for CF-testen er 172,5 (n=38) fordelt med en gennemsnitlig Se på 89 og en gennemsnitlig Sp på 83,5.

Undersøgelsen, som dækker tidsperioden 1969-2003, viser også, at fra 1995-2003 ligger den gennemsnitlige PI væsentlig tættere på 200 end i perioden fra 1969-1995.

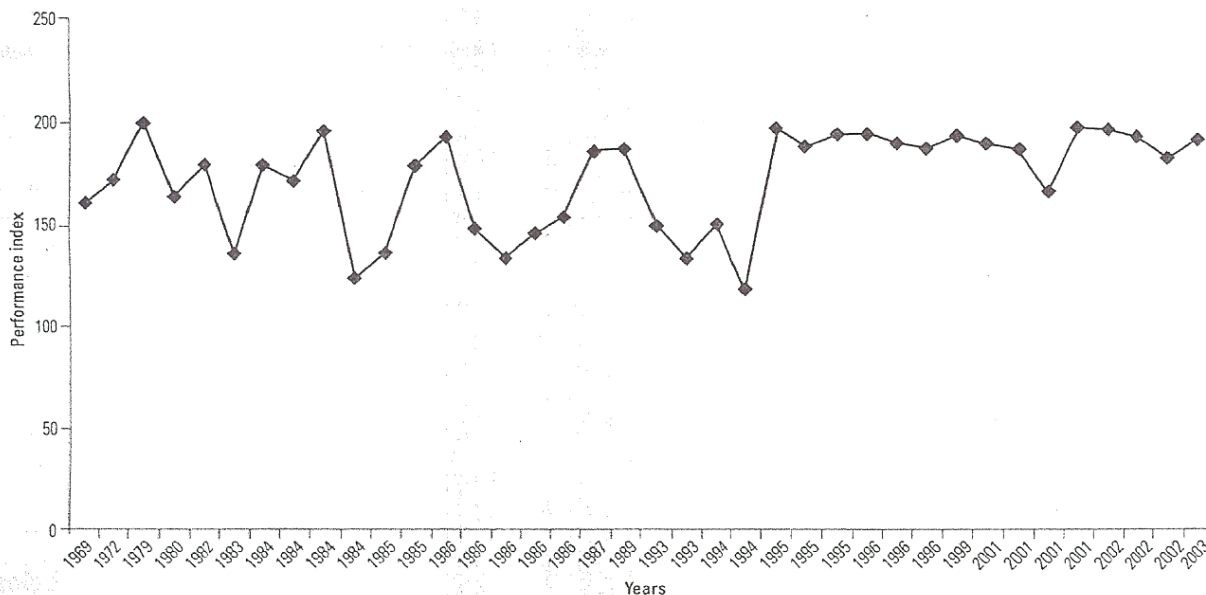


Fig. 3
Performance indices (the average of the sum of the sensitivity and specificity values) of 38 Complement fixation tests reported in the literature between 1969 and 2003

Figur 4: PI for 38 CF-test, rapporteret i litteraturen mellem 1969 og 2003.²²

Som fejkilder ved CF-testen nævner undersøgelsen bl.a. mangel på standardisering, manglende evne til at teste hæmolyserede prøver, anti-komplementære resultater, ”prozoning” (et sekundært fænomen, hvor koncentrationen af antigen, antistoffer eller begge, er uden for ækvivalens zonen.)²² Den gør dog også opmærksom på, at kvaliteten og sikkerheden af testen fra 1995 og frem er blevet væsentlig bedre.²²

I en reference fra 1978 nævnes en TBE titer på 1:20 som pålidelig og 1:40 som klar positiv ved en CF-test.²¹ I referencen fra laboratoriet Diavet bestemmes den negative titer værdi til <1:10.¹⁴

Det kunne tages som et udtryk for en mere sikker CF-test i 2005 i forhold til 1978.

Den relativ lave Se værdi i undersøgelsen kunne forklares med, at der kun blev medtaget 21 af de 29 hunde, som blev testet i 2004, på grund af manglende kliniske oplysninger på de sidste 8 hunde. Havde alle hundene været repræsenteret, ville Se = 0,97 (28 positive ud af 29), hvilket stemmer bedre overens med litteraturen.²²

Man ved, at hunde har en væsentlig større kontaktflade med *I. ricinus* end mennesker, og at prævalensen i endemiske områder for sero-positive hunde kan være helt op til 30 %.^{10,11}

Man ved også, at langt de fleste hunde som inficeres med TBE virus ikke udviser nogen eller kun meget uspecifikke symptomer på TBE.¹ En forklaring kan være, at hundens immunsystem er væsentlig bedre end menneskets, og den vil derfor være bedre i stand til at eliminere virus inden blod-hjerne barrieren passerer.^{3, 11}

Derfor kan en positiv titer være et resultat af en sådan asymptomatisk infektion, og titersvaret fortæller kun, at hunden på et tidspunkt har været i kontakt med inficerede flåter.⁶

Det kunne forklare, hvorfor 15 hunde i gruppe B havde en positiv titer.

6 af hundene havde en primær titer mellem 1:20-1:80 og blev derfor kontroltestet efter 2-3 uger. På det tidspunkt havde de alle serokonverteret. Det kunne derfor ikke afvises, at de 6 hunde var nyinficerede med TBE-virus og havde haft et asymptomatisk forløb.

Med den viden var en lav SP og en høj OR for CF-testen forventelig.

Omvendt kunne det ikke afvises, at de 9 hunde som havde en titer værdi på 1:10 var falsk positive, da værdien 1:10 lå i grænseområdet.

Konklusion

TBE er en velkendt human infektiøs lidelse i CNS, som blev beskrevet første gang i 1931.⁸ Hos hund er det første tilfælde beskrevet i 1972, og indtil da betragtede man hunde som værende relativ resistente over for sygdommen.^{11,12} Der er ikke tvivl om, at langt de fleste hunde, som bliver inficeret med virus, primært fungerer som vært for både virus og flåt uden nogensinde at udvise kliniske symptomer på sygdommen – MEN, det er omvendt også svært at forestille sig, at inficerede flåter findes på Bornholm, i Norge og Sverige, i resten af Europa men ikke i resten af Danmark !

Hundeejere rejser mere end nogensinde med deres hunde, og hundene er en af de bedste ambassadører for overførsel af sygdomsagens fra et område til et andet.⁸

Derfor skal vi som dyrlæger også have TBE med som en differentialdiagnose, hvis vi pludselig står med en akut syg hund, febril og med udtalte neurologiske symptomer og foretage de nødvendige undersøgelser med henblik på en korrekt diagnose.

”Er der virkelig tale om en ”ny” sygdom eller har den været til stede hele tiden – vi har bare ikke undersøgt for den ?”

Litteraturliste

1. Weissenböck, H., Suchy, A., Holzmann, H.: Tick-borne encephalitis in dogs: neuropathological findings and distribution of antigen. *Acta Neuropathol* 1998, 95, 361-366.
2. Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., Studdert, M.J.: *Veterinary Virology* 1999, Third Edition, pp 555-563.
3. Tipold, A.: Zentraleuropäische Zeckenzephalitis – eine Übersicht. *Tierärztl Prax* 2002, 30 (K), 106-110
4. Yoshii, K., Hayasaka, D., Goto, A., Obara, M., Araki, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Ivanov, L., Mizutani, T., Kariwa, H., Takashima, I.: Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens expressed in mammalian cells for serodiagnosis of tick-borne encephalitis. *J Virol Methods* 2003, 108, 171-179.
5. Chiba, N., Iwasaki, T., Mizutani, T., Kariwa, H., Kurata, T., Takashima, I.: Pathogenicity of tick-borne encephalitis virus isolated in Hokkaido, Japan in mouse model. *Vaccine* 1999, 17, 779-787.
6. Reiner, B., Fischer, A.: Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) beim Hund in Deutschland: Zwei Fallberichte. *Kleintierpraxis* 1998, 43(4), 255-268.
7. Leschnik, M.W.; Kirtz, G.C.; Thalhammer, J.G.: Tick-borne encephalitis (TBE) in dogs. *Int J Med Microbiol* 2002, 291(Suppl. 33), 66-69.
8. Bellamy, R., Salmon, R.: Risk of importation of diseases exotic to Great Britain following the relaxation of quarantine regulations. *Q J Med* 1999, 92, 683-687.
9. 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). *Int J Med Microbiol* 2002, 291(Suppl. 33), 33-42
10. Reiner, B., Fischer, A., Gödde, T., Müller, W.: Clinical Diagnosis of Canine Tick-borne Encephalitis (TBE): Contribution of Cerebrospinal Fluid Analysis (CSF) and CSF Antibody Titers. *Zent bl Bakteriol* 1999, 289, 605-609.
11. Klimes, J., Juricova, Z., Literak, I., Schanilec, P., Trachta e Silva, E.: Prevalence of antibodies to tickborne encephalitis and West Nile flaviviruses and the clinical signs of tickborne encephalitis in dogs in the Czech Republic. *Veterinary Record* 2001, 148, 17-20.
12. Rosiu, N., Topciu, VL., Munteanu, S.: The presence of antibodies to some flaviviruses in the dog. *Rev Roum Med-Virol* 1980, 31(2), 143-144
13. Kristiansen, K.: TBE in Denmark – in particular on Bornholm. *Int J Med Microbiol* 2002, 291(Suppl.33), 62-63.
14. Institute Virion Ltd, Bernadette Saner-Neppele, Ph.D, Weingartenstrasse 9, CH-8803 Rüschlikon: Reagents for the Tick-borne Encephalitis virus (FSME Virus) Complement Fixation (CF) Test (Arbejdsskema for CF testen)
15. Lennette, E.H., Schmidt, N.J. (eds): *Diagnostic Procedures for: Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*, Fifth Edition, pp 35-42. American Health Association, New York 1979
16. Aasted, B., Leslie, G., Agger, R.(eds): *Immunologi*, pp 152-153. DSR Forlag Landbohøjskolen, København 1989.
17. Martin, S.W., Meek, A.H., Willeberg, P.: *Veterinary Epidemiology – principles and methods*, pp 124-132. Iowa State University press / Ames 1987
18. Statcalc: Epi-info Version 6, 1993
19. Haglund, M.: Occurrence of TBE in areas previously considered being non-endemic: Scandinavian data generate an international study by the International Scientific Working Group for TBE (ISW-TBE). *Int J Med Microbiol* 2002, 291(suppl.33), 50-54.
20. Kirtz, G., Kölbl, S., Czettel, B., Thalhammer, J.G.: Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME, Zentraleuropäische Zeckenzephalitis) beim Hund in Österreich: eine Seroprävalenz-Studie. *Kleintierpraxis* 2003, 48(3), 133-140.
21. Granström, M., Grandien, M., Saikku, P.: Early Diagnosis of Tick-Borne Encephalitis (TBE) by demonstration of Specific IgM antibodies. *Scand J Infect Dis* 1978, 10, 97-100.
22. Gall, D., Nielsen, K.: Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. *Rev sci tech Off int Epiz* 2004, 23(3), 989-1002.

Bilagsoversigt.

Bilag 1: Tabel 1: Oversigt over hunde testet positive for TBE i 2004 hos VML.

Bilag 2: Tabel 2: Skema over klinisk syge hunde med en positiv TBE titer.

Bilag 3: Tabel 3: Skema over klinisk raske hunde fra Gentofte Dyreklinik.

Bilag 4: Principper og arbejdsmetode ved CF-testen (Uddrag fra reference nr. 16.)

Bilag 1:

Tabel 1: Oversigt over hunde testet positive for TBE i 2004 hos VML.

Lab nr.	Dato	Navn	Hundenavn	Indsender	Tittersvar
830847	60704	Jakob Tofte	Rasmus	Kbh's Dyrehosp.	80
724259	80904	Lise Christensen	Nala	Kbh's Dyrehosp.	80
732433	140904	Anne Kristensen	Shanti	Kbh's Dyrehosp.	20
734251	150904	Charlotte Baarts	Kuba	Kbh's Dyrehosp.	80
890358	180804	Kirsten B. Olesen	Rico	Kbh's Dyrehosp.	80
712188	310804	Kirsten B. Olesen	Rico	Kbh's Dyrehosp.	40*
728066	100904	Helle Larsen	Albert	Kbh's Dyrehosp.	10
770049	91004	Helle Larsen	Albert	Kbh's Dyrehosp.	20*
746649	230904	Marianne Larsen	Heike	Kbh's Dyrehosp.	40
766427	71004	Marianne Larsen	Heike	Kbh's Dyrehosp.	20*
794426	271004	Randi Wagner	Ricco	Kbh's Dyrehosp.	40
812812	91104	Randi Wagner	Ricco	Kbh's Dyrehosp.	80*
825522	171104	Annette Ben Amar	Charlie	Kbh's Dyrehosp.	20
737727	300404	Susanne Forchhammer	Mira	Stenløse	40
799281	150604	Allan Christensen	Murphy	Stenløse	40
716230	20904	Allan Christensen	Murphy	Stenløse	20*
893804	200804	Claus Kristensen	Jason	Stenløse	160
818685	121104	Claus Kristensen	Jason	Stenløse	40*
854994	220704	Anette Dahlgaard	Devin	Hillerød	40
865237	290704	Eva Tofte Jørgensen	Rasmus	Hillerød	10*
879565	100804	Celina Claudi Jacobsen		Hillerød	80
736252	160904	Klaus Strøm	Snoopy	Hillerød	80
714069	10904	Celina Jacobsen	Bertram	Farum	80*
732424	140904	Hanne Kappel	Janus	Farum	40
812119	230604	Birgitte Bak	Julie	Viby	20
850879	200704	Jan Hansen	Oline	Viby	40
838616	100704	Jette Seedorf	Hund	St. Rørbæk	40
853664	210704	P. Monberg	Nugget	Bagsværd	80
803931	31104	Kirsten Birk	Hodja	Bagsværd	40
863030	280704	Hanne Bøckhaus	Dream	Frederiksberg C	neg
746656	230904	Camilla Jacobsen	Indi	Hellerup	40
873294	181204	Vita Dams	Luna	Hellerup	20
884152	291204	Lisbet Plum	Itchy	Hellerup	40

879610	100804	Jannie B. Olsen	Rasmus	Karlslunde	80
799300	150604	Helle Koch	Charlie	Dyssegård	80
714021	10904	Jonna Sangill	Frida	Næstved	40
760025	21004	Karina Skovgaard	Hund	Galten	20

37 totalt
28 positive
8 kontroller = *
1 negativ

Bilag 2:

Tabel 2: Skema over klinisk syge hunde med en positiv TBE titer.

Hunde	Race	Alder	Køn	Symptomer	Titter/ kontrol	Borrelia	Erlichia	Neo spora
1 [⊠]	Collie†	8	M	Febril, neuro.sympt., G-I	80/10*	neg	neg	
2	Kh.Gravhund	2	F	Febril,	80	neg	neg	
3	Blanding	7	F	Febril, ataxi	20	neg	neg	
4	Kl.Münsterl.	1	M	Febril, neuro.sympt.	80	neg	neg	
5	Dv.puddel†	2	M	Neuro.sympt.	80/40*	neg	neg	
6 [⊠]	Border C.bl.	1	M	Febril, kramper	10/20*	neg	neg	
7	Pekingeser	8	M	Subfebril, neuro.sympt.	40/20*	neg		
8	Labrador	7	M	Slinger, ataxi	40/80/10*			
9	Ml.puddel	1	M	Febril, kramper	20			
10	Labrador	6	M	Febril, G-I, ataxi	80/80*	neg		neg
11	Riesenschn.	1	M	Halt forben	40	pos•	neg	
12	New Foundl.	<1	M	G-I, hævede led	40	neg	neg	
13	Chesapeake	6	M	G-I, træt, uoplagt	80			
14	Labrador	8	F	Febril, træt,	40	neg		
15	Labrador	6	F	Vedvarende febril	20	neg	neg	
16	Nova Scotia†	1	M	Smerter, neuro.sympt. #	40	neg		
17	Rottweiler	5	M	Febril, neuro.sympt.	160/40*	neg		
18	Boxer	8	M	Neuro.sympt., facialis parese	40/20*	neg		
19	Golden ret.	5	F	Sløvhed, ataxi	40	neg		
20	Dv.Rh.gravh	<1	F	Lokale kramper i kæbe trist, hallucineret ?	40			
21	Shetlands S	9	M	G-I, ataxi højre side	40	neg		neg

⊠: Undersøgt cerebrospinalvæske (CSF)

*: Kontroltitler for TBE taget 2-3 uger efter primær prøve.

•: Kontroltitler for Borrelia var negativ.

†: Hund nr.1 og 5 blev euthaniseret pga. recidiv, hund nr.16 døde i den akutte fase

#: Obduktionsrapport

Forkortelser:

G-I: Gastro-intestinale symptomer

Neuro. sympt.: Neurologiske symptomer

Bilag 3:

Tabel 3: Skema over klinisk raske hunde fra Gentofte Dyreklinik.

Hunde	Race	Alder	Køn	Titter / kontrol	Borrelia	Ehrlichia
1	Ruh. Gravhund	2	F	<10		
2	Cairn terrier	11	M	40/20*		
3	Langh. Gravhund	10	M	20/10*		
4	Welsh Springer	9	F	<10		
5	Golden retriever	11	M	10		
6	Flatcoated retriev	8	M	80/10*		
7	Griffon	10	M	<10		
8	Bearded collie	1	M	<10		
9	Amr. Bulldog	1	M	<10		
10	Cocker	8	M	<10		
11	Petit Basset	13	F	10		
12	Bichon Frissé	8	M	20/10*		
13	Boxer	10	M	<10		
14	Foxterrier bl.	9	F	<10		
15	Labrador	13	M	10		
16	Labrador	11	F	<10		
17	Isl. Fårehund	6	M	10		
18	Tysk korthåret	1	F	10		
19	Australsk Sheph	5	F	<10		
20	Alaskan Malamute	8	F	10		
21	D/S-gårdhund	6	F	<10		
22	Hovawart	5	M	<10		
23	Berner Sennen	5	F	<10		
24	Irsk Setter	2	M	<10		
25	Ruh. Gravhund		F	40/10*	pos•	neg
26	Spinone	2	F	80/10*		
27	D/S-gårdhund	1	F	<10		
28	Weimaraner	10	F	<10		
29	WHW	11	F	<10		
30	Labrador	1	M	10	pos•	
31	Dv. Schnauzer	10	M	<10		
32	WHW	6	F	10		
33	Labrador	8	M	<10		
34	Golden Retriever	9	F	20		
35	Labrador	13	M	<10		

*: Kontroltitler for TBE taget 2-3 uger efter primær prøve.

•: Kontroltitler for Borrelia var negativ.

Bilag 4:

Principper og arbejdsmetode ved CF-testen (Uddrag fra reference nr. 16.)

En meget benyttet metode til påvisning af komplementbindende antistoffer. Som regel benyttes frisk eller frysetørret marsvineserum som komplementkilde.

I alt indgår 5 forskellige reagenter i metoden:

1. Serum (testprøve fra dyrlæge) Dette må være varmeinaktiveret i 30 min. ved 56°C.
2. Antigen
3. Marsvineserum (komplementkilde)
4. Kaninantistoffer mod fåreerythrocytter (hæmolysin). Dette serum er også varmeaktiveret.
5. Fåreerythrocytter.

4. og 5. udgør det såkaldte indikatorsystem.

Hovedprincippet er flg: Ved for-for forsøg fastlægges bestemte mængder af 3, 4 og 5 således, at man finder den mindste mængde af 3 og 4 til at hæmolysere 5. Disse mængder benyttes fremover. CF-testen udføres derefter i 2 trin.

Først inkuberes forskellige koncentrationer af 1 med 2 og 3.

Hvis der er komplementbindende antistoffer i 1, vil komplementet bindes.

Dernæst tilsættes 4 og 5 i de afstemte mængder.

Hvis komplementet er blevet brugt i første trin vil der ikke været noget til overs til andet trin og man vil se en negativ hæmolytisk aktivitet i indikatorsystemet.

Dette er bevis for, at der er antistoffer til stede i den analyserede prøve. Ved titrering bestemmes endvidere styrken af disse antistoffer.

Hvis der ikke er antistoffer til stede vil der ikke være forbrugt komplement i første trin, og al aktiviteten genfindes i andet trin. Ved tilsætning af indikatorsystemet ses da fuld hæmolytisk aktivitet.