

Litteratur

- Jensen LS, Parvaiz I, Utzon J et al. Esofagusresektioner i Danmark i 1997-2000. Ugeskr Læger 2002;164:4423-7.
- Kuo EY, Chang Y, Wright CD. Impact of hospital volumen on clinical and economic outcomes for oesophagectomy. Ann Thorax Surg 2001;72:1118-24.
- Whooley BP, Law S, Morthy SC et al. Analysis of reduces death and complication rates after esophageal resection. Ann Surg 2001;233:338-44.
- Jensen LS, Pilegaard HK, Pahlé E. Evaluation and resection of carcinoma of esophagus and the esophagastric junction. Scand J Gastroenterol 2002; 37(suppl 235):nr. 42.
- Jensen LS, Dalsgaard J. Omkostningseffektivitet ved regionalisering af øsofagusresektioner i Danmark. Ugeskr Læger 2004;166:2555-9.
- Kehlet H, Wilmore DW. Multi-modal strategies to improve surgical outcome. Am J Surg 2002;183:630-41.
- Chandrashekar MV, Irving M, Wayman J et al. Immediate extubation and epidural analgesia allow safe management in a high-dependent unit after a two-stage oesophagectomy. Br J Anaesth 2003;90:474-9.
- Neal JM, Wilcox RT, Allen HW et al. Near-total esophagectomy: the influence of standardized multimodal management and intraoperative fluid restriction. Reg Anesth Pain Med 2003;28:328-34.

Tætheder af skovflåten (*Ixodes ricinus*) og koeksistens af Louping ill-virus og tick borne encephalitis-virus på Bornholm

Cand.agro. Per M. Jensen,

1. reservelæge Sigurdur Skarphedinsson & biokemiker Alexander Semenov

Den Kongelige Veterinær- og Landbohøjskole, Institut for Økologi, Sektion for Zoologi, Odense Universitetshospital, Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, og St. Petersburg Virology Centre, Department of Molecular Diagnostics, Russia

Resumé

Introduktion: Skovflåten *Ixodes ricinus*, der er endemisk i Danmark og det meste af Europa, er vektor for flavivirus som Louping ill (LI)-virus og tick borne encephalitis (TBE)-virus. Dette studie blev foretaget med henblik på at undersøge forekomsten af tre forskellige flavivirus: TBE-, LI- og Powassan (POW)-virus på Bornholm.

Materiale og metoder: Flåter blev samlet ved *flagging* af vegetationen på otte forskellige lokaliteter inden for tre dage i juni 1999. Virus blev påvist med revers transkriptionspolymerasekædereaktion (RT-PCR).

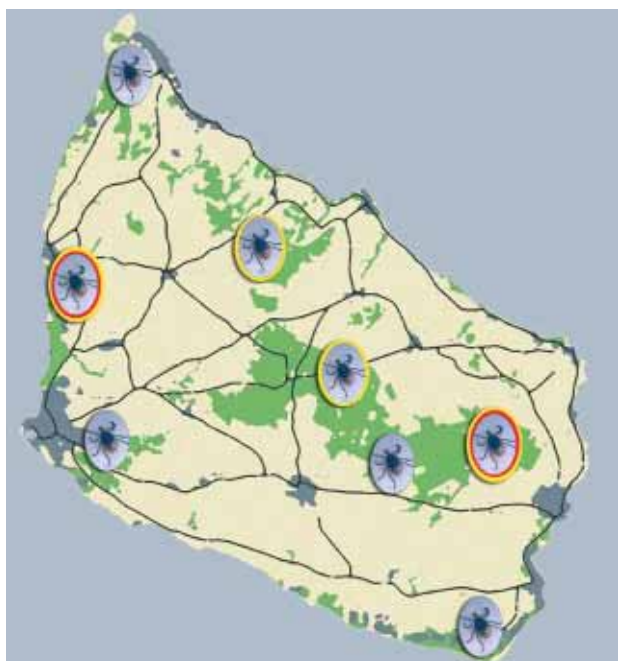
Resultater: *Pools* af nymfer blev fundet positive for både TBE- og LI-virus. Ingen prøver var positive for POW-virus. Der blev fundet minimumprævalens på ~0,5% for TBE-virus og ~2% for LI-virus. Flåttætheden af nymfer lå på 2,5-5,5 pr. minut.

Diskussion: LI-virus er ikke tidligere fundet i Danmark. Yderligere undersøgelser af LIV-udbredelse i Danmark er indiceret. Prævalensen af TBEV-inficerede flåter på Bornholm synes at være sammenlignelig med prævalensen fra andre TBEV-endemiske områder i Europa. Fundet af LIV i Danmark bør have in mente ved tolkning af TBE-serologi i Danmark da serologisk krydsreaktivitet mellem disse virus kan forventes.

udsat for flåtbid. Disse flavivirus tilhører en gruppe virus, der betegnes *tick borne* encephalitis (TBE)-komplekset. I Europa er de infektioner hos mennesker kendt under forskellige navne som *Russian spring sommer encephalitis* (RSSE), *Central European encephalitis* (CEE) og *Früh-sommer-meningo-encephalitis* (FSME). En fælles betegnelse for disse infektioner er *tick borne* encephalitis, da antigenvariationen mellem disse virus er så beskeden, at de anses for at være subtyper af det samme virus [1]. Hvert år rammes omkring 11.000 mennesker i Rusland og 3.000 i det øvrige Europa af TBE [2]. To andre virus, der tilhører TBE-komplekset i Europa, er Louping ill (LI)-virus og Powassan (POW)-virus. LI er primært kendt som et veterinært problem, men 39 infektioner af mennesker er beskrevet i litteraturen, de fleste (26) dog relateret til smitte ved laboratoriearbejde. POW-virus-infektion blev først beskrevet i Canada og kun få tilfælde er beskrevet i Europa, alle fra Rusland [1, 3]. Flåter af familien *Ixodes* er vektorer for disse virus. Skovflåten *Ixodes ricinus* overfører TBE-virus og LI-virus, mens *Ixodes persulcatus* overfører POW-virus i Europa. Om *I. ricinus* er vektor for POW-virus vides ikke [4-8]. Det er karakteristisk for de flåtoverførte encefalitter, at de har en fokal forekomst. TBE har således været kendt endemisk på Bornholm siden 1950'erne, men er ikke fundet i andre dele af Danmark [9, 10]. I Sverige har TBE primært været at finde i området omkring den svenske skærgård og Mälaren. I de seneste år er der set stigning i antal TBE-tilfælde i Sverige, og nye tilfælde er set uden for de tidligere kendte risikoområder [11]. I 1998 blev de første kliniske tilfælde af TBE beskrevet fra Norge [12]. TBE er i øvrigt kendt fra Finland, Rusland, de baltiske lande, Polen og Tyskland. LI er derimod kendt fra Irland, Skotland og Norge. Danmark er således omgivet af LI mod vest og nord og TBE mod øst og syd. Formålet med denne undersøgelse var at klarlægge forekomsten af de tre flavivirus,

De flåtoverførte encefalitter er en gruppe af flavivirusinfektioner, der kan ramme både mennesker og dyr, der bliver

VIDENSKAB OG PRAKSIS | ORIGINAL MEDDELELSE



Figur 1. Lokalteter, hvor flåter blev indsamlet på Bornholm. Tick borne encephalitis-positivt område ●; Louping ill-positivt område ●.

TBE-virus, LI-virus og POW-virus, i flåter samt at vurdere flåttætheden på Bornholm.

Materiale og metoder

Flåter blev samlet ved *flagging* af vegetation på otte forskellige skovlokaliteter, inden for tre dage i juni 1999 (Figur 1). Tætheden af flåter var baseret på 2-10 indsamlinger af 20 minutters varighed hvert sted. Lokalteterne blev udvalgt med henblik på at dække øen ligeligt geografisk set ud fra en forventning om at TBE-risikoområdet kunne præciseres.

Efter indsamlingen og indtil analyse blev flåterne opbevaret ved -20°C . Pools af henholdsvis ti nymfer og 20 nymfer blev anvendt som grundlag for påvisning af virus. Flåterne

blev vasket med 70% ethanol, tørret og frosset i flydende nitrogen, og homogeniseret. Total RNA-DNA-fraktionen blev ekstraheret med phenol-chloroform-ekstraktion med efterfølgende ethanoludfældning.

RNA-prøver blev inkuberet med TBE-virus-rev primer ved 70°C i 5 min og 0°C i 10 min. Revers transkriptionspolymerasekædereaktion (RT-PCR) blev udført med avian myeloblastosis (AMV)-revers transkriptase ved 42°C (en gang), cDNA blev anvendt til PCR: 95°C i 5 s, (95°C i 30 s, 55°C i 40 s, 72°C i 40 s) \times 35, 72°C i 5 s. Den samme protokol blev anvendt til virusgenotypering af *1st stage amplicon* i en nested-PCR. Produktstørrelse (ca.): TBEV 370 b.p., POW 310 b.p. og LI 250 b.p. Primere til NS1-gene af TBE var: *reverse common*: 5' CCC ATC ACT CCT GTG TCA CACT (554R), TBE forward: 5' AAC AGA CTT GA(G/A) ATG GCC ATG TGG AG (184F), LI *forward*: 5' ACG ACC CTA CTG ACT ACC GAG G (279F), POW *forward*: 5' GCT TCA CCA CGC AGA TCC AAG (234F). Primerne blev designet efter oplysninger fra genbanken. Ved statistisk analyse blev der anvendt Fishers eksakte test.

Resultater

Et samlet antal på 3.843 nymfer og 215 voksne flåter blev indsamlet. Alle flåterne tilhørte *Ixodes ricinus*. Nymfetæthederne blev fundet at være 2,5-5,5 pr. minut (Tabel 1), mens tætheden af voksne varierede mellem 0,1 og 0,3 pr. minut. Ingen prøver blev fundet positive for POW-virus, men derimod var fire pools positive i RT-PCR for LI-virus, og to pools var positive for TBE-virus. Prøver indsamlet om eftermiddagen var hyppigere positive end prøver indsamlet tidligere på dagen (5 af 13 pools vs. 1 af 20 pools, $p = 0,0214$). Af i alt 240 nymfer indeholdt mindst fire nymfer LI-virus og mindst en TBE-virus, hvilket indikerer, at prævalensen er omtrent 2% for LI og 0,5% for TBE. De positive prøver var geografisk jævnt fordelt over Bornholm (Figur 1), og TBE-positive områder var ikke adskilte fra LI-positive områder.

Tabel 1. Tætheder af skovflåtnymfer og forekomst af Louping ill (LI)- og tick borne encephalitis (TBE)-virus, for prøver indsamlet morgen, middag og aften.

Lokalitet, antal indsamlinger	Tætheder af nymfer antal pr. flagging-minut			LI-virus pool af 10, pool af 20			TBE-virus pool af 10, pool af 20		
	morgen	middag	efter- middag	morgen	middag	efter- middag	morgen	middag	efter- middag
Hammershus, 9	5,4 \pm 2,3			-, -			-, -		
Tofte, 2	3,3 \pm 0,3			+, -			-, +		
Rø Plantage, 6	2,5 \pm 1,5			-, +			-, -		
Grisby, 10	3,5 \pm 3,9			-, -			-, -		
Almindingen (vest), 5	4,8 \pm 4,12			+, -			-, -		
Almindingen (øst), 6	3,2 \pm 1,8			-, -			-, -		
Troldstuerne, 6	2,6 \pm 0,7			+, -			-, -, + ^a		
Dueodde, 6	3,8 \pm 1,9			-, -			-, -		

a) Ekstra pool af 50 nymfer, udført med henblik på at finde to uafhængige prøver med forekomst af TBE.

-: Negativ polymerasekædereaktions-resultat.

+: Positiv polymerasekædereaktions-resultat.

VIDENSKAB OG PRAKSIS | ORIGINAL MEDDELELSE

Diskussion

LI-virus er ikke tidligere fundet i Danmark. Infektioner med LI-virus af mennesker er meget sjældne i de lande, hvor infektion er kendt endemisk, såsom Irland, og de synes at have et mildere forløb end TBE. Sygdommen har et bifaset forløb som TBE. Ingen dødsfald er beskrevet efter LI-infektion hos mennesker [1]. Selv om LI-infektion næppe udgør et medicinsk problem i Danmark, kan det ikke afvises, at den er af veterinær betydning. Yderligere undersøgelser med dyrkning og sekvensering af virus er indiceret, og da den østlige grænse for LI-virus' udbredelse nu synes at have nået Bornholm, bør forekomst af LI-virus i andre områder af Danmark klarlægges. Da der er udtalt serologisk krydsreaktivitet mellem LI- og TBE-virus, bør fundet af LI-virus i Danmark have in mente ved tolkning af TBE-serologi i Danmark. Døgnvariation i forekomsten af inficerede flåter er velkendt bl.a. fra *Borrelia burgdorferi* og forekommer også her [13]. Af de positive flåt-pools i denne undersøgelse blev alle undtagen en indsamlet om eftermiddagen. Da flåter imidlertid ikke blev indsamlet om eftermiddagen fra alle områder, er præcisering af risikoområder ud fra disse data umulig. De positive områder synes dog at være jævnt fordelt over Bornholm. Tætheden af flåter svarede rimeligt til forventningen, baseret på tidligere studier over flåttætheder i Danmark [14]. Ud fra disse forventes flåttætheden af nymfer på Bornholm at være ca. 4,9 nymfer pr. minut i juni måned. Den lidt lavere tæthed kan sandsynligvis forbindes med stedvis højtliggende granit, der resulterer i hyppigere udtørring af jorden, hvilket forventes at have negativ indflydelse på flåtpopulationen.

Da flåterne blev analyseret i pools, kan prævalensen af TBE-virus ikke bestemmes præcist, men det fundne niveau synes at være sammenligneligt med prævalensen i andre endemiske områder i Europa [8, 15]. Dette understøttes tillige af, at antallet af konstaterede kliniske tilfælde er 2-4 pr. år blandt de 40.000 fastboende Bornholmere. Fra Bornholms Amt angives det, at det samlede antal turister til øen er ca. 400.000 om året, dvs. ti gange antallet af fastboende. En betydelig del af disse turister må formodes at være danskere [16]. Dette sammenholdt med øget rejseaktivitet til lande i Østeuropa, der for størstedelen er klassificeret som TBE-risikoområder, gør, at opmærksomheden på TBE i Danmark bør skærpes.

Korrespondance: Sigurdur Skarphedinsson, Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, Odense Universitetshospital, DK-5000 Odense C. E-mail: siggi@inet.uni2.dk

Antaget: 26. februar 2004

Interessekonflikter: Ingen angivet

Undersøgelsen blev gennemført under projektet: Scientific Co-operation between Danish Research Groups and Groups from the St. Petersburg area (Russia) med økonomisk støtte fra Direktoratet for FødevarerErhverv (FOM-sagsnr.: 960864).

Litteratur

1. Monath TP, Heinz FX. Flaviviruses. I: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology 3rd ed. Vol 1. Philadelphia: Lippenkroft Raven Publishers, 1996:961-1034.
2. Gritsun TS, Lashkevich VA, Gould EA. Tick-borne encephalitis. Antivir Res 2003;57:129-46.

3. Telford SR, Foppa IM. Tickborne encephalites. I: Cunha BA, ed. Tickborne infectious diseases diagnosis and management. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000:193-213.
4. Sonenshine DE. Biology of ticks, Vol II. New York: Oxford University Press Inc, 1993:157-65.
5. Minar J. Natural foci of tick-borne encephalitis in central Europe and the relationship of the incidence of Ixodes ricinus to original ecosystems. Cent Eur J Public Health 1995;3:33-7.
6. Kowalewski EI, Korenberg YV. Main features of tick-borne encephalitis eco-epidemiology in Russia. Zentralbl Bakteriol 1999;289:525-39.
7. Hubalek Z, Pow I, Ried HW et al. Antigenic similarity of central European encephalitis and Louping ill viruses. Acta virol 1995;39:251-6.
8. Ried HW. Louping ill. I: Monath TP, ed. The arboviruses: epidemiology and ecology, Vol III. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1988:117-35.
9. Freundt EA. The western boundary of endemic tick-borne meningo-encephalitis in southern Scandinavia. Acta Path 1963;57:87-103.
10. Statens Serum Institut. Tick borne encephalitis på Bornholm. EPI-Nyt 2001, nr. 17.
11. Lindgren E, Gustafson R. Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change. Lancet 2001;358:16-8.
12. Ormaasen V, Brantsaeter AB, Moen AB. Tick-borne encephalitis in Norway. Tidsskr Nor Lægeforen 2001;121:807-9.
13. Dubinina HV, Alekseev AN, Jensen PM et al. Daily activity of uninfected and Borrelia infected Ixodes ricinus (Acarina Ixodidae): Lyme Borreliosis risk evaluation for different time intervals. Ekologija 2000;4:27-31.
14. Jensen PM, Hansen H, Frandsen F. Spatial risk assessment in Denmark of Lyme Borreliosis in Denmark. Scand J Infec Dis 2000;32:545-50.
15. Suss J, Schrader C, Abel U et al. Annual and seasonal variation of tickborne encephalitis virus (TBEV) in ticks in selected hot spot areas in Germany using a nRT-PCR: results from 1997 and 1998. Zentralbl Bakteriol 1999;289: 564-78.
16. www.Bornholm.dk/amtet/praesentation/turisme_folder.htm/ jan 2002.