

**En demografisk studie; Prevalensen av TBEV i Esbo och på Drumsö i Helsingfors, Finland.**

Gabriel von Troil

Medicine kandidat

Helsingfors universitet

Avdelningen för virologi

Helsingfors 22.3.2020

Avhandling, fördjupade studier

[gabriel.vontroil@helsinki.fi](mailto:gabriel.vontroil@helsinki.fi)

Handledare: Olli Vapalahti

HELSINGFORS UNIVERSITET

Medicinska fakulteten

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto - Fakultet/Sektion - Faculty Medicinska fakulteten		Laitos – Institution – Department Avdelningen för virologi	
Tekijä - Författare - Author Gabriel Filip Samuel von Troil			
Työn nimi – Arbetets titel – Title En demografisk studie; TBEV prevalens i Esbo och på Drumsö i Helsingfors, Finland.			
Oppiaine - Läroämne - Subject Medicin; Virologi; Zoonotisk virologi			
Työn laji – Arbetets art - Level Pro-gradu studie, fördjupade studier		Aika – Datum – Month and year 20.03.2020	Sivumäärä - Sidoantal – Number of pages: 8 + 3
Tiivistelmä - Referat – Abstract  <p>Antalet smittfall av fästingburet encefalitvirus (TBEV) har ökat och nya riskområden för TBEV har identifierats årligen i Finland under det senaste årtiondet. Som resultat av ökat intresse hos lokala invånare att utreda över nyintroducerade TBEV riskområden initierades detta projekt år 2016 i samarbete med Helsingfors universitets virologiska avdelning och det privatägda företaget Skärgårdsdoktorn Ab, att samla fästingar från Drumsö och senare testa dessa på TBEV (RNA). Senare kom projektet också att innefatta Esbo.</p> <p>Materialet samlades under åren 2016 - 2017 och bestod av fästingar samlade lokalt både direkt från naturen, samt fästingar som låtits hämtas in utav privatpersoner till utgivna lokalisationer. Det slutliga materialet bestod av 754st fästingar varav 666st härstammade från Esbo och 88st härstammade från Drumsö i Helsingfors.</p> <p>Laboratorieanalyserna gjordes i Helsingfors universitets virologiska avdelnings utrymmen. Utav enstaka fästingar isolerades RNA och DNA lösning i separata provrör i en manuell laboratorieprocess, och senare genomgick dessa lösningar automatiserade TBEV (RNA) respektive Borrelia Burgdorferi tester. Denna rapport behandlar endast TBEV testerna och deras resultat.</p> <p>I de slutliga TBEV testerna hittades 7st TBEV RNA positiva fästingar, av vilka alla härstammade från 3 olika regioner i Esbo; Esbogård, Tomtekulla och Larsvik. Av dessa områden var Larsvik det ända varifrån det inte tidigare rapporterats några TBEV smittor.</p> <p>Resultaten i denna studie är i linje med tidigare kända uppgifter över TBEV demografi i den finska huvudstadsregionen och antyder för potentialen även till ytterligare spridning till övriga lokalisationer inom detta område.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Tick-borne encephalitis virus; TBEV; Flaviviridae; Helsinki Metropolitan Area, Lauttasaari; Espoo			
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited Helsingfors universitet / Helda E-Thesis			
Muita tietoja - Övriga uppgifter – Additional information			

## Innehållsförteckning

1. <i>Inledning</i> .....	4
2. <i>Bakgrund</i> .....	4
3. <i>Material</i> .....	5
4. <i>Metoder</i> .....	7
4.1 Homogenisering av fästingar i TriPure® reagens.....	7
4.2 Isolering av RNA.....	8
4.3 Isolering av DNA.....	8
4.4 TBEV tester.....	8
5. <i>Resultat</i> .....	9
6. <i>Diskussion</i> .....	9
7. <i>Referenser</i> .....	10

## **1. Inledning**

Förekomsten av TBEV (fästingburet encefalitvirus) har ökat och flera nya riskområden har introducerats i Finland under det senaste årtiondet. Ursprungligen ansågs TBEV förekomma endemiskt på Åland, i Åbolands skärgård samt i regioner vid Villmanstrand och Karleby åtminstone sedan 1960-talet (1), och mera specifikt i mindre endemiska populationer inom dessa områden (2-5). På 1990-talet introducerades Mjölö i Helsingfors yttre skärgård som ett nytt endemiskt TBEV område utöver de tidigare nämnda (6). Sedan 2008 har nya endemiska TBEV områden konstaterats årligen i Finland (2,7–9) och efter 2011 har också nya lokalt anskaffade TBEV infektioner årligen rapporterats hos invånare i huvudstadsregionen.

Syftet med denna studie var ursprungligen att utreda förekomsten av TBEV och bakterien *Borrelia burgdorferi* hos fästingar regionalt från Drumsö i Helsingfors. Studie initierades som ett projekt att i samarbete med Helsingfors universitets virologiska avdelning och det privatägda företaget Skärgårdsdoktorn AB utreda det rådande nuläget, samt huruvida TBEV överhuvudtaget förekommer på Drumsö i Helsingfors, som följd av upprepad förfrågan av lokala invånare. På detta område hade det inte tidigare utförts några studier gällande TBEV förekomst, och det hade heller inte rapporterats några tidigare lokalt anskaffade TBEV smittor. Senare kom studien också att innefatta Esbo p.g.a. ökat intresse hos lokala invånare även här att utreda det rådande nuläget över TBEV prevalensen, efter annonsering av studien i lokala tidskrifter.

Materialet samlades under åren 2016 och 2017, och de slutliga TBEV (RNA) testerna gjordes under slutet av våren 2018. Denna rapport behandlar endast TBEV undersökningarna och dess resultat.

## **2. Bakgrund**

Fästingburet encefalitvirus (TBEV) är ett flavivirus (genus *Flavivirus*, familj *Falviviridae*) som kliniskt orsakar encefalit hos människor. I naturen cirkulerar TBEV i en cykel mellan fästingar och deras värddjur. Till värddjuren hör främst mindre däggdjur och fåglar. Människan är en slumpmässig värd och deltar inte i den naturliga cykeln. Globalt sett drabbas ca 13 000

människor årligen över olika delar av Europa och Norra Asien av TBEV infektioner, främst genom smittor som drabbar det centrala nervsystemet (10).

Förtillfället känner man till 3st bekräftade undergrupper av TBEV; Den europeiska (Eur)-, den siberiska (Sib)-, och den s.k. fjärran östern eller Far-Eastern (FE) undertypen. TBEV-Eur bärs främst av *Ixodes ricinus* fästingar i centrala och nordöstra Europa medan TBEV-Sib och TBEV-FE främst hittas i fästingsarten *Ixodes Persulcatus* på områden mellan nordöstra Europa till Ryssland (fjärran östern), Kina och Japan (10). Nyligen har 2 nya undergrupper av TBEV (Himalayas och Balkans undertyper) karakteriserats (11,12).

Finland ligger vid den mest nordliga gränsen för endemiskt förekommande TBEV i Europa. På 1960-talet demonstrerades de första cirkulationerna av TBEV antikroppar hos nötkreatur på endemiska områden i skärgården vid Åland och Åbo samt i Villmanstrand och Karleby (1). TBE viruset begränsades till endast dessa områden i årtionden tills Mjölö senare på 1990-talet introducerades som ett nytt TBEV område i Finland (6). Sedan 2008 har nya endemiska TBEV områden årligen introducerats i Finland (2,7–9), och efter 2011 har TBEV smittor har även årligen rapporterats av personer som smittats i huvudstadsregionen. Den ny skedda spridningen av TBEV har delvis tänkts bero på klimatförändringen vilket påverkat värddjurens/vektorernas beteendemönster.

Spridningen av TBEV samt den ökade mängden TBEV infektioner i den tätbefolkade och ständigt växande huvudstadsregionen, hem till ca 1,2 miljoner invånare, tillsammans med uppskattningar om en förbättrad mikroklimatisk lämplighet för etablerandet av TBEV längs med den södra finska kusten (13) har skapat oro bland delar av den lokala befolkningen, vilket fick oss att initiera denna studie.

### **3. Material**

Materialet anskaffades fr.o.m. våren 2016 till hösten 2017. 2016 initierade forskningsgruppen insamlingen av fästingar genom att vid upprepade tillfällen samlas och låta föra lakanförsedda träkäppar över lokal vegetation på Drumsö för att låta fästingarna fästa sig på lakanen. Fästingar som fäst sig på lakanen togs sedan tillvara på med pincett och sattes i åtskilda provrör som sedan

ställdes i frys för förvar. Insamlingen av fästingar på detta vis gjordes under enstaka tillfällen åren 2016–2017. År 2017 besökte forskningsgruppen också 2 utvalda områden i Tomtekulla i Esbo varifrån det tidigare rapporterats 2st TBEV smittor. Härifrån samlades totalt 6st fästingar med samma metod.

På grund av bristfälligt material under insamlingen år 2016 beslöt forskningsgruppen år 2017 att också låta privatpersoner delta i insamlingen genom att låta hämta fästingar till Skärgårdsdoktorn Ab regionala fästingsbussar. Samtidigt utvidgades forskningen också att innefatta Esbo i och med ett väckt intresse hos lokala invånare i Esbo att delta i insamlingen. Studien reklamerades i lokala tidskrifter och anvisningar över vilka uppgifter som skulle inkluderas i samband med inhämtandet av fästingarna publicerades på företagets hemsidor. Uppgifterna innefattade; var och när fästingen hittats, huruvida fästingen hittats från naturen, på ett husdjur eller från en människa, och huruvida fästingen var fastbiten eller fritt gående i samband med infångningen. Inhämtarens kontaktuppgifter togs också till vara på. Fästingarna ombads omslutas i foliepapper och ställas i förvar i frystemperatur innan inhämtning.

Fästingarna som hämtades till fästingsbussarna separerades i skilda provrör och de ovannämnda uppgifterna samlades på skilda blanketter. Provrören förvarades i frystemperatur. Senare nummerades provrören enligt motsvarande blanketter och uppgifterna samlades elektroniskt i en tabell. Förutom de ovannämnda uppgifterna uppskattades också fästingarnas kön, utvecklingsfas samt huruvida de varit blodätta. Senare fördes materialet till Helsingfors universitets virologiska avdelning kylutrymmen för förvaring.

Det slutliga materialet bestod av 666st fästingar från Esbo och 88st från Drumsö. De mera noggranna uppgifterna angående datum av insamling, region från vilken fästingen hittats, uppskattat kön eller utvecklingsstadiet, varifrån fästingen hittats, huruvida fästingen varit fastbiten i husdjur eller människa, samt huruvida fästingen varit blod äten finns sparad i en elektronisk tabell tillsammans med inhämtarens kontaktuppgifter.

## 4. Metoder

Laboratoriemetoderna för utredning av TBEV resultaten innefattade en process där fästingsmaterial först homogeniserades i en TriPure® reagens, varefter DNA och RNA isolerades i separata provrör ur den homogeniserade lösningen. Det isolerade RNA genomgick sedan en automatiserad TBEV RT-PCR process för utredning av TBEV. Provrören med isolerad DNA lösning sattes i förvar för senare B.Burgdorferi tester, vilka inte behandlas i denna rapport.

Homogeniseringen och isoleringen av DNA och RNA gjordes i Helsingfors universitets virologiska avdelnings laborieutrymmen under perioden 11/2017 - 1/2018 och utfördes i enlighet med TriPure® reagensens tillverkares instruktioner (Roche). TBEV RT-PCR testerna utfördes senare under våren 2018.

### 4.1 Homogenisering av fästingar i TriPure® reagens.

Till provrören med fästingar applicerades ca. 200 µl steril sand samt en 5 mm (diameter) glaskula. Härtill applicerades också 900 µl TriPure® reagens till provröret med en pipett. Innehållet i provröret blandades om med en MagnaLyser®, 7000 rpm, i 2 upprepade omgångar på 15 sekunder med nedkylning emellan omgångarna. Nedkylningen utfördes genom att ställa provrören ca 30 sekunder i ett -20 °C kylblock.

Härefter tillades 1 µl glykogen (10 µg/µl) i provrören för homogenisering. Efter ca. 5 min inkubationstid tillsattes 0,2 ml kloroform varefter innehållet i provröret blandades om med en Vortex® maskin. Efter ytterligare 2–15 min inkubationstid centrifugerades proverna (12 000 x g, 15 min, +4 °C). Under centrifugeringen bildades det 3 separata faser av lösningen; En klar övre RNA fas, en grumlig protein fas mellerst, samt en ljusröd nedre DNA fas.

Den klara RNA fasen avlägsnades med pipett och lades i ett separat provrör med motsvarande numrering för fortsatt behandling (steg 4.2). Den grumliga proteinfasen avlägsnades med pipett och kasserades. Det ursprungliga provröret med den resterande DNA fasen ställdes i frysen (-20°C) för senare behandling (steg 4.3).

## **4.2 Isolering av RNA.**

Till provrören med RNA lösning tillsattes 0,5 ml isopropanol, varefter provrören vändes om och efter ca. 5–10 min inkubationstid sattes provrören i centrifug (12 000 x g, 10 min, +4°C). Vätskan kasserades från provröret och till den kvarvarande RNA massan på provrörets botten tillades 1 ml 75% EtOH. Provrören ställdes i förvar i frysen (-20°C) för senare TBEV tester (steg 4).

## **4.3 Isolering av DNA.**

Provrören med DNA lösning togs ur kylförvaringen. Den ljusröda DNA fasen avlägsnades med pipett till ett annat provrör med motsvarande numrering. De ursprungliga provrören med resterande sand, glaskula och rester av fästingen kasserades. Till de nya provrören tillsattes 0,3 ml 96% EtOH varefter provrören vändes om för omblandning samt efter ca. 2–3 min inkubationstid ställdes provrören i centrifug (2000 x g, 5 min, +4°C).

Vätskan i provröret kasserades och till den kvarvarande DNA massan på provrörets botten tillsattes 1 ml 0,1 M Na-citrat i 10% EtOH. Här efter stod lösningen i inkubation följande 30 min med omblandning med jämna mellanrum. Efter inkubationstiden sattes provrören i centrifug (2000 x g, 5 min, +4°C). Efter centrifugeringen kasserades återigen vätskan och samma ovannämnda process med 0,1 M Na-citrat i 10% EtOH sköljning upprepades ytterligare två gånger (sammanlagt 3 sköljningar).

Efter den tredje sköljningen tillsattes 1 ml 75% EtOH i provröret och lösningen ställdes i frysen för förvar och senare B.Burgdorferi tester.

## **4.4 TBEV tester.**

TBEV RT-PCR testerna gjordes i pooler på 3 och utfördes med Taqman fast virus 1-step mastermix (Thermo Fischer Scientific), 500 nM primers och 200 nM sond, i enlighet med tidigare beskrivning (14).



## 5. Resultat

Totalt 754st fästingar samlade från människor, husdjur eller direkt från naturen på Drumsö eller från Esbo genomgick de slutliga TBEV testerna. Utav dessa konstaterades 7st fästingar TBEV RNA positiva. 5st av dessa härstammade från 2 olika katter i Esbogård vid Köklax, ett område där det också tidigare ansetts förekomma TBEV endemiskt i fästingspopulationer baserat på ett patientfall rapporterat år 2017. De två övriga regionerna varifrån en fästing var testade TBEV RNA positivt var Tomtekulla, vilket även tidigare ansetts vara ett endemiskt TBEV område på basis av 3st tidigare rapporterade patientfall, samt Larsvik, var inga tidigare TBEV patientfall rapporterats.

## 6. Diskussion

TBE virusets epidemiologi har förändrats i Finland under det senaste årtiondet, och innan 2011 var TBEV enligt dåtida kännedom begränsat till en enda holme i Helsingfors yttre skärgård på Mjölö i den finska huvudstadsregionen. Efter 2011, då den första lokalt anskaffade TBEV smittan rapporterades i Helsingfors sedan 1990-talet, har nya lokalt anskaffade TBEV smittor rapporterats årligen hos invånare i huvudstadsregionen.

TBEV cirkulationen i naturen anses vara väldigt sensitiv till olika miljöfaktorer, så som det lokala mikroklimatet samt bl.a. värddjurens populationstäthet (13,15-17). Enligt klimatmodeller lämpade sig mikroklimatet i Helsingfors för TBEV cirkulation redan vid millenniumskiftet (18), och dessa uppgifter tillsammans med faktumet om ett fortsatt förändrat klimat i den finska huvudstadsregionen kan befoga misstankar om ytterligare spridning av TBEV i detta område.

Våra resultat är i linje med tidigare känd information över TBEV prevalensen i huvudstadsregionen. Resultaten stöder den tidigare uppfattningen om TBEV förekomst i mindre endemiska populationer, och bekräftar Esbogård samt Tomtekulla som endemiska TBEV riskområden i Esbo. Förutom dessa identifierades också Larsvik som ett nytt endemiskt riskområde. Hänvisandes till konstaterandet om de förändrade klimatförhållandena i den finska huvudstadsregionen samt den allmänna pågående trenden av TBEV spridning i Finland, kom

detta fynd så till vida inte som en överraskning, och fyndet är i linje med förväntningarna som antogs i samband med initierandet av studien.

Utav de 88st fästingarna insamlade från Drumsö i Helsingfors testade inga TBEV RNA positivt. Från Drumsö har det så till vida inte ännu konstaterats TBEV som lokalt anskaffade smittor eller hos fästingar som fångats från Drumsö och testats för TBEV. Vi känner ändå till att Drumsö fyller kriterierna som ett mikroklimatiskt lämpat område för etablering av TBEV enligt klimatmodeller som baserar sig på miljöförhållanden och förekomsten av lämpliga vektorer i området. Då man också beaktar de bekräftade endemiska TBEV populationerna som identifierats i närliggande områden till Drumsö, så kan Drumsö ännu anses som ett märkbart riskområde för TBEV, vilket vidare bör beaktas i samband med vaccinrekommendationer samt vid användning av One Health tillvägagångssätt vid evaluering av risker och begränsningar som berör den allmänna befolkningshälsan.

## 7. Referenser

- (1) Tuomi J, Brummer-Korvenkontio M. Antibodies against viruses of the tick-borne encephalitis group in cattle sera in Finland. *Ann Med Exp Biol Fenn.* 1965;43:149-154.
- (2) Jaaskelainen AE, Toneteri E, Sironen T, et al. European subtype tick-borne encephalitis virus in *Ixodes persulcatus* ticks. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:323-325.
- (3) Laaksonen M, Sajanti E, Sormunen JJ, et al. Crowdsourcing-based nationwide tick collection reveals the distribution of *Ixodes ricinus* and *I. persulcatus* and associated pathogens in Finland. *Emerg Microbes Infect.* 2017;6:1-7.
- (4) Tonteri E, Jaaskelainen AE, Tikkakoski T, et al. Tick-borne encephalitis virus in wild rodents in Winter, Finland, 2008-2009. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:72-75.
- (5) Tonteri E, Jokelainen P, Matala J, et al. Serological evidence of tick-borne encephalitis virus infection in Moose and Deer in Finland: SENTINELS for virus circulation. *Parasit Vectors.* 2016;9:54-016-1335-6.
- (6) Han X, Aho M, Vene S, et al. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks in Finland. *J Med Virol.* 2001;64:21-28.
- (7) Tonteri E, Kurkela S, Timonen S, et al. Surveillance of endemic foci of tick-borne encephalitis in Finland 1995-2013: evidence of emergence of new foci. *Euro Surveill.* 2015;20(37):pii=30020.
- (8) Jaaskelainen A, Tonteri E, Pieninkeroinen I, et al. Siberian subtype tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* in a newly emerged focus, Finland. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7:216-223.

- (9) Sormunen JJ, Klemola T, Hanninen J, et al. The Importance of study duration and spatial scale in pathogen detection-evidence from a tick-infested island. *Emerg Microbes Infect.* 2018;7:1-11.
- (10) Lindquis L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet.* 2008;371:1861-1871.
- (11) Dai X, Shang G, Lu S, et al. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet plateau, China. *Emerg Microbes Infect.* 2018;7:e74.
- (12) Kovalev SY, Mukhacheva TA. Reconsidering the classification of tick-borne encephalitis virus within the Siberian subtype gives new insights into its evolutionary history. *Infect Genet Evol.* 2017;55:159-165.
- (13) Randolph SE, Rogers DJ. Fragile transmission cycles of tick-borne encephalitis virus may be disrupted by predicted climate change. *Proc Biol Sci.* 2000;267:1741-1744.
- (14) Schwaiger M, Cassinotti P. Development of quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J Clin Virol.* 2003;27:136-145.
- (15) Jaenson TGT, Petersson EH, Jaenson DGE, et al. The importance of wildlife in the ecology and epidemiology of the TBE virus in Sweden: incidence of human TBE correlates with abundance of deer and hares. *Parasit Vectors.* 2018;11:477.
- (16) Lindgren E, Gustafson R. Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change. *Lancet.* 2001;358:16-18.
- (17) Randolph S.E., Green R.M., Peacey M.F. and Rogers D.J., Seasonal synchrony: the key to tick-borne encephalitis foci identified by satellite data. *Parasitology.* 121 (Pt 1) (2000), pp. 15-23.
- (18) Randolph SE. The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme Borreliosis in Europe. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001;356:1045-1056.