Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

DZIEDZINA **:** nauk medycznych i nauk o zdrowiu

DYSCYPLINA: nauki medyczne

ROZPRAWA DOKTORSKA

Ocena narażenia środowiskowego na zachorowanie na kleszczowe zapalenie mózgu w północno-wschodniej Polsce oraz analiza biomarkerów tej choroby u dzieci

Autor: Lek. Ewa Bojkiewicz

Promotor: Prof. dr hab. Artur Sulik

Promotor pomocniczy: Dr hab. Kacper Toczyłowski,

Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci, Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny w Białymstoku

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. Artur Sulik

Rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej UMB

Białystok, 2025

Medical University of Bialystok

FIELD OF SCIENCE: medical and health sciences

SCIENTIFIC DISCIPLINE: medical sciences

DOCTORAL THESIS

Assessment of environmental exposure to tick-borne encephalitis in northeastern Poland and analysis of disease biomarkers in children

Author: lek. Ewa Bojkiewicz

First supervisor: Prof. dr hab. Artur Sulik

Assisting supervisor: Dr hab. Kacper Toczyłowski

Department of Pediatric Infectious Diseases, University Children's Clinical Hospital in Bialystok

Head of department: Prof. dr hab. n. med. Artur Sulik

The doctoral thesis was carried out as a part of education at the Doctoral School of MUB

Bialystok, 2025

Składam serdeczne podziękowania
Promotorowi prof. dr hab. Arturowi Sulikowi,
Promotorowi pomocniczemu dr hab. Kacprowi Toczyłowskiemu
za opiekę merytoryczną, życzliwość
oraz pomoc podczas przygotowania niniejszej pracy.

Pracę dedykuję moim Rodzicom i rodzinie.

Spis treści

1. Wykaz skrótów

BBB – bariera krew mózg (ang. *blood-brain barrier*)

CCL2 – chemokina CCL2 (ang. *chemokine C-C motif ligand 2)*

CHI3L1– ludzka chitynaza 3 typu 1 (ang. *Human Chitinase-3-like Protein 1*)

CXCL2 – chemokina CXCL2 (ang. *C-X-C motif chemokine ligand 2*)

DALY - lata życia skorygowane niesprawnością (ang. *disability-adjusted life years)*

ELISA – test immunoenzymatyczny (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

ICTV- Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (ang. *International Committee on Taxonomy of Viruses*)

IFN-γ – interferon γ

IgG – immunoglobulina G

IgM – immunoglobulina M

IL-4 – interleukina 4

Il-6 – interleukina 6

Il-13 – interleukina 13

KZM – kleszczowe zapalenie mózgu

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PMR – płyn mózgowo-rdzeniowy

TBEV – wirus kleszczowego zapalenia mózgu (ang. *tick-borne encephalitis virus*)

TNF- α – czynnik martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor α)*

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

Qalb – iloraz albumin

2. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

2.1 Prace oryginalne:

- **The Prevalence of Asymptomatic Infections with Tick-Borne Encephalitis Virus and Attitude towards Tick-Borne Encephalitis Vaccine in the Endemic Area of Northeastern Poland.**

Bojkiewicz E, Toczylowski K, Grygorczuk S, Zelazowska-Rutkowska B, Dunaj J, Zebrowska A, Czupryna P, Moniuszko-Malinowska A, Sulik A. (2022). Vaccines (Basel) 10(8):1294.
doi: 10.3390/vaccines10081294
IF – 7.8 , MEiN – 140 pkt

- **The Role of Chitinase 3-Like-1 (YKL-40) and Proinflammatory Biomarkers in the Pathogenesis of Pediatric Tick-Borne Encephalitis in a Polish Cohort.**

Bojkiewicz E, Toczyłowski K, Lewandowski D, Martonik D, Flisiak R, Sulik A. (2024). Journal of Inflammation Research 5:17:10239-10254.
doi: 10.2147/JIR.S480556
IF –4.2 , MEiN – 140 pkt

2.2 Praca przeglądowa:

- **Tick-borne encephalitis - a review of current epidemiology, clinical symptoms, management and prevention.**

Bojkiewicz E, Toczyłowski K, Sulik A. (2020). Przegląd Epidemiologiczny 74(2):316-325.
doi: 10.32394/pe.74.24
MEiN – 40 pkt

3. Zestawienie publikacji:

Rodzaj publikacji	Liczba	Impact Factor	Punktacja MNiSW/MEiN
Prace włączone do rozprawy doktorskiej	3	12	320
Prace, które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej	5	23,713	550
Streszczenia zjazdowe	17	0	0
Razem	**25**	**35,713**	**870**

4. Wstęp

Kleszczowe zapalenie mózgu (KZM) to choroba ośrodkowego układu nerwowego (OUN) wywołana przez wirus kleszczowego zapalenia mózgu (TBEV, ang. *tick-borne encephalitis virus*). TBEV należy do rodziny *Flaviviridae*, rodzaju *Orthoflavivirus* (do niedawna *Flavivirus*). Zgodnie z klasyfikacją przedstawioną w 2023 roku przez Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (ICTV, ang. International Committee on Taxonomy of Viruses), nazwa gatunkowa tego wirusa została zmieniona na *Orthoflavivirus encephalitidis*. Nadal jednak powszechnie stosowana jest jego angielska nazwa, a skrót TBEV nie został zmieniony[1].

Choroba przenoszona jest głównie przez kleszcze z gatunku *Ixodes ricinus* i występuje endemicznie w umiarkowanym klimacie Europy oraz Azji, gdzie odnotowuje się ponad 10 000 przypadków rocznie[2]. W Polsce odsetek kleszczy *Ixodes ricinus* zakażonych tym wirusem wynosi od 0,21% do 0,42% a rocznie w całym kraju rejestruje się około 200–300 zachorowań. Terenem endemicznym zachorowań jest województwo podlaskie, gdzie notuje się średnio 45% wszystkich przypadków KZM, a lokalna zapadalność wynosi od 4,45 do 9,16 na 100 000 mieszkańców. Współczynnik śmiertelności dla europejskiego podtypu wirusa wynosi około 1%[3,4].

Według najnowszych badań wirus TBEV jest jednym z najważniejszych przedstawicieli rodzaju *Orthoflavivirus*, występującym w Polsce, który wywołuje zakażenia OUN[5,6]. Przebieg kliniczny choroby jest zróżnicowany – od bezobjawowego po ciężkie zapalenie mózgu lub rdzenia kręgowego. Zakażenie zwykle rozpoczyna się nieswoistymi objawami grypopodobnymi, takimi jak gorączka, a następnie może prowadzić do rozwoju zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenia mózgu lub jednoczesne zapalenia mózgu, opon mózgowo-rdzeniowych i rdzenia kręgowego. Rozpoznanie choroby najczęściej stawiane jest w drugiej fazie zakażenia, zwykle podczas hospitalizacji pacjenta[7].

Warto podkreślić, że wiele łagodnych lub bezobjawowych infekcji pozostaje niezdiagnozowanych, co tłumaczy obecność przeciwciał anty-KZM IgG u zdrowych osób zamieszkujących obszary endemiczne[8,9]. Sugeruje to, że znaczna część zakażeń przebiega bezobjawowo lub manifestuje się jedynie łagodnymi, przemijającymi objawami grypopodobnymi. Przyczyny zróżnicowanego przebiegu klinicznego choroby nie są w pełni poznane. Przypuszcza się, że zmienność kliniczna KZM jest związana z osobniczymi różnicami w odpowiedzi układu odpornościowego. Identyfikacja takich przypadków dostarczyłaby cennych informacji na temat patogenezy choroby i pozwoliłaby na lepsze zrozumienie czynników zwiększających ryzyko ciężkiego przebiegu – zarówno tych genetycznych, jak i środowiskowych.

Powikłania po zakażeniu stanowią istotny problem, gdyż aż 46% pacjentów doświadcza niepełnego powrotu do zdrowia i następstw neurologicznych, takich jak niedowłady nerwów czaszkowych, niedowłady połowicze, zaburzenia równowagi, problemy z pamięcią i zmniejszoną tolerancję na stres[4,10]. Niezależnie od ciężkości przebiegu, u części ozdrowieńców występuje pozapalny zespół postencefaliczny. We Włoszech 1,6% pacjentów z KZM wymagało pobytu w oddziale intensywnej terapii[11]. Brak specyficznego leczenia oraz duże obciążenie powikłaniami mierzone wskaźnikiem DALY (liczba lat życia skorygowanych o niepełnosprawność) podkreślają znaczenie szczepień[12]. Pomimo zaleceń WHO dotyczących szczepień na terenach endemicznych, ich poziom w Polsce pozostaje niski – w 2021 r. zaszczepionych było 0,18% populacji Polski (w województwie podlaskim 0,5% mieszkańców otrzymało szczepienie przeciwko KZM)[4].

Diagnostyka infekcji opiera się na kryteriach klinicznych oraz wykrywaniu specyficznych przeciwciał przeciwko KZM w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR). Typowe zmiany w PMR obejmują zwiększone stężenie albumin, podwyższony wskaźnik IgG oraz początkową przewagę neutrofili[13]. Kluczowe znaczenie w patogenezie KZM ma naruszenie bariery krew-mózg (BBB ang. *blood-brain barrier*) oraz odpowiedź humoralna. Wirus prawdopodobnie infekuje komórki śródbłonka, zwiększając przepuszczalność BBB, co umożliwia jego przenikanie oraz komórek układu odpornościowego do mózgu. Cząsteczki prozapalne, w tym cytokiny i chemokiny, nasilają uszkodzenie tkanek i powodują pojawienie się objawów neurologicznych[14].

Chitynaza 3 typu 1 (CHI3L1) stanowi obiecujący marker procesów zapalnych toczących się w OUN. Podwyższony poziom CHI3L1 obserwowano w różnych schorzeniach, takich jak choroba Alzheimera, stwardnienie rozsiane czy pourazowe uszkodzenie mózgu. Mikroglej obecny w OUN produkuje CHI3L1 w odpowiedzi na stan zapalny, a jego wytwarzanie regulują różne cytokiny i chemokiny, m.in. INF-γ, TNF- α, IL-4, IL-6, IL-13, CCL2, CXCL2 i chemeryna[15-18].

Zrozumienie dynamiki zmian stężenia CHI3L1 w przebiegu KZM oraz jego związku z innymi czynnikami pro- i przeciwzapalnymi przyczyni się do poszerzenia wiedzy na temat patogenezy choroby oraz umożliwi identyfikację potencjalnych możliwości terapeutycznych. Przeprowadzone badania markerów zapalnych w PMR u osób dorosłych są obiecujące,nadal jednak dostępnych jest niewiele danych dotyczących populacji pediatrycznej na obszarach endemicznych, takich jak Polska. Celem moich badań jest wypełnienie tej luki poprzez wyjaśnienie w jaki sposób infekcja wirusem KZM zmienia przepuszczalność BBB. W toku prowadzonych badań oceniono również związek CHI3L1 ze stężeniem cytokin zapalnych, integralnością BBB, odpowiedzią immunologiczną i ciężkością infekcji u dzieci i młodzieży. Uzyskana wiedza może przyczynić się do opracowania nowych metod leczenia, które zapobiegałyby lub ograniczałyby następstwa neurologiczne po zachorowaniu na KZM u dzieci.

5. Cele pracy

1. Ocena seroprewalencji zakażeń TBEV wśród mieszkańców północno-wschodniej Polski.
2. Analiza postaw wobec szczepionki przeciwko KZM wśród respondentów z północno-wschodniej Polski.
3. Ocena przydatności oceny stężenia białka CHI3L1 w surowicy krwi i PMR jako biomarkera ciężkości przebiegu KZM w populacji pediatrycznej.
4. Analiza związku CHI3L1 ze stężeniem cytokin zapalnych, integralnością bariery krew-mózg, odpowiedzią immunologiczną i ciężkością KZM u dzieci i młodzieży.

6. Materiały i metody

6.1 Ocena seroprewalencji zakażeń TBEV wśród mieszkańców północno-wschodniej Polski.

Przeprowadziliśmy badanie obecności przeciwciał IgG anty-KZM w próbkach surowicy pobranej od 300 dorosłych, zdrowych dawców krwi w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Białymstoku. Przed oddaniem krwi, zgodnie ze standardową procedurą kwalifikacyjną, wykluczono aktywne infekcje, w tym wirusowe zapalenie wątroby typu C. Każdy uczestnik wypełnił ankietę zawierającą pytania dotyczące przebytych zakażeń wirusem KZM oraz szczepień przeciw tej chorobie. Dwie osoby nie zwróciły ankiet, dlatego zostały wykluczone z analizy. Ostateczna grupa badawcza liczyła 298 osób, wśród których 71% stanowili mężczyźni, a 29% kobiety. Wiek uczestników wynosił od 18 do 63 lat, ze średnią 34,1 roku. Badana grupa pediatryczna składała się ze 180 dzieci hospitalizowanych w Klinice Obserwacyjno-Zakaźnej Dzieci Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego w Białymstoku. Dzieci te, w wieku od 2 do 17 lat, były przyjęte z objawami wirusowego zapalenia żołądka i jelit. Próbki ich surowicy wykorzystano w badaniach nad epidemiologią i patogenezą chorób zakaźnych w populacji pediatrycznej prowadzonych w ramach wcześniejszych projektów badawczych.

Badania serologiczne przeprowadzono przy użyciu zestawu FSME/TBE ELISA IgG/IgM firmy Virotech Diagnostics GmbH (Rüsselsheim, Niemcy), ściśle przestrzegając instrukcji producenta.

6.2. Analiza postaw wobec szczepionki przeciwko KZM wśród respondentów z północno-wschodniej Polski.

Przeprowadziliśmy anonimową ankietę w kohorcie 444 dorosłych osób, których zrekrutowaliśmy wśród rodziców dzieci hospitalizowanych w Klinice Obserwacyjno-Zakaźnej Dzieci Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego w Białymstoku. Wszyscy respondenci mieszkali w północno-wschodniej Polsce, czyli obszarze wysokiego ryzyka chorób przenoszonych przez kleszcze. Ankieta została przeprowadzona w okresie od grudnia 2019 roku do września 2021 roku. Składała się z czterech pytań dotyczących praktyk związanych z kleszczami oraz siedmiu pytań oceniających dane demograficzne i poziom narażenia na ukąszenia kleszczy.

6.3. Ocena przydatności oceny stężenia białka CHI3L1 w surowicy krwi i PMR jako biomarkera ciężkości przebiegu KZM w populacji pediatrycznej.

Do badania włączono 22 dzieci ze zdiagnozowanym KZM, hospitalizowanych w Klinice Obserwacyjno-Zakaźnej Dzieci Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego w Białymstoku. Pacjentów podzielono na 2 grupy: chorych na zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu (n=6) i zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (n-=16). Rozpoznanie KZM opierało się na obecności swoistych przeciwciał IgG i IgM przeciwko KZM w surowicy i/lub w PMR. Stopień ciężkości choroby oceniano za pomocą skali numerycznej oraz standaryzowanego kwestionariusza, zgodnie z publikacją Petry Bogovic z 2014 roku [1]. Skala ta była pierwotnie stosowana w populacji osób dorosłych, jednak ze względu na brak badań w populacji pediatrycznej zdecydowano się na jej zastosowanie w niniejszej analizie. Określoną liczbę punktów (od 1 do 9) przypisywano na podstawie obecności, intensywności oraz czasu trwania poszczególnych objawów, takich jak:

- ból głowy, gorączka, wymioty i objawy oponowe,
- drżenie, niedowłady, zatrzymanie moczu i zaburzenia funkcji poznawczych,
- zaburzenia świadomości, konieczność oraz czas trwania leczenia podwyższonego ciśnienia śródczaszkowego.

Klinicznie łagodny, umiarkowany i ciężki przebieg choroby odpowiadał zakresom punktowym:

- 0–8 pkt – przebieg łagodny,
- 9–22 pkt – przebieg umiarkowany,
- >22 pkt – przebieg ciężki.

6.4 Analiza związku CHI3L1 ze stężeniem cytokin zapalnych, integralnością bariery krew-mózg, odpowiedzią immunologiczną i ciężkością KZM u dzieci i młodzieży.

Przepuszczalność BBB oceniano za pomocą ilorazu albuminy (Q-alb) i na podstawie tego wskaźnika korygowano stężenia analizowanych białek w PMR. Współczynnik PMR/surowica obliczono dzieląc stężenie każdej cytokiny lub chemokiny w PMR przez stężenie w surowicy (biomarker w PMR/biomarker w surowicy). Indeks PMR/surowica określono jako stosunek ilorazów każdej badanej chemokiny lub cytokiny i albuminy (Q-biomarker/Q-albumina). Do ilościowej oceny CHI3L1, CCL-2, CXCL2, chemeryny, INF- γ, IL-1, IL-4, IL-6, IL-13, TNF- α zastosowano testy Luminex (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) w próbkach surowicy i PMR przy przyjęciu (T1) i 14 dni później, po ustąpieniu objawów (T2). Wszystkie metodologie i procedury testów ściśle przestrzegały wytycznych producenta i ustalonych protokołów laboratoryjnych. Badanie uzyskało zgodę lokalnej Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (numer zgody APK 002.104.2022 i APK.002.545.2023) i zostało sfinansowane z dotacji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (numer dotacji B.SUB.24.447).

7. Wyniki

7.1 Ocena seroprewalencji zakażeń TBEV u wśród mieszkańców północno-wschodniej Polski.

Spośród wszystkich badanych dorosłych, u czterech osób w przeszłości zdiagnozowano KZM, jednak u żadnej z nich nie stwierdzono obecności przeciwciał IgG anty-KZM. Szczepienie przeciwko KZM zadeklarowało 38 dorosłych (13%, w tym 31 mężczyzn i 7 kobiet), z czego dwie osoby otrzymały niepełny schemat (tylko jedną lub dwie dawki), a jedna nie przyjęła dawki przypominającej w ciągu ostatnich 15 lat. U 26 zaszczepionych osób (68%) wykryto swoiste przeciwciała IgG przeciwko KZM. Co ciekawe, najwyższe miano przeciwciał odnotowano u pacjenta, który ostatnią dawkę szczepionki przyjął 15 lat temu. W grupie 256 osób, które nie były zaszczepione i u których nie zdiagnozowano KZM, pozytywny wynik uzyskało 14 dorosłych (5%, po równo: 7 mężczyzn i 7 kobiet). Grupę pediatryczną stanowiło 180 dzieci w wieku od 2 do 17 lat (mediana wieku: 6 lat). Żadne z nich nie było zaszczepione przeciwko KZM ani hospitalizowane z powodu tej choroby. Pozytywny wynik uzyskano u czworga dzieci (2%).

7.2. Analiza postaw wobec szczepionki przeciwko KZM wśród respondentów z północno-wschodniej Polski..

Ankieta była przeprowadzona pośród 444 osób dorosłych. Większość respondentów stanowiły kobiety (82%) w wieku 30–39 lat (59%), z wykształceniem wyższym (66%), mieszkających w miastach (59%). Ponad połowa ankietowanych (62%) przynajmniej raz w życiu została ukłuta przez kleszcza, przy czym 17% doświadczyło tego w ciągu ostatniego roku. Ponadto 32% respondentów zadeklarowało, że ich dziecko miało kontakt z kleszczem w przeszłości. Szczepienie przeciwko KZM zgłosiło jedynie 9% dorosłych, a swoje dzieci zaszczepiło 10% badanych. Wśród osób niezaszczepionych co trzecia wyraziła chęć zaszczepienia się w przyszłości, natomiast aż 25% przyjęło postawę antyszczepionkową. Podobne tendencje zaobserwowano wśród rodziców – 37% planowało zaszczepić swoje dzieci, podczas gdy 20% deklarowało brak zgody na takie szczepienie. Analiza statystyczna wykazała, że większą skłonność do szczepienia miały osoby, które niedawno zostały ukłute przez kleszcza, miały bliskiego krewnego z rozpoznaną chorobą odkleszczową lub były mężczyznami. Dodatkowo zaobserwowano, że młodsze osoby częściej prezentowały negatywną postawę wobec szczepień.

7.3. Ocena przydatności oceny stężenia białka CHI3L1 w surowicy krwi i PMR jako biomarkera ciężkości przebiegu KZM w populacji pediatrycznej.

Na podstawie numerycznej skali ciężkości choroby większość przypadków była oceniona jako umiarkowana, a pozostałą część sklasyfikowano jako łagodną lub ciężką. Nie wszystkie cytokiny były wykrywalne w materiale pobranym od pacjentów, co ograniczało obliczenia niektórych współczynników i wskaźników płynu mózgowo-rdzeniowego/surowicy. Dotyczyło to w szczególności CXCL2, IL-4, IL-1, IL-13 i INF-γ. W przypadku CH3L1 zaobserwowano istotne statystycznie zmniejszenie stężenia tego biomarkera w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych. Natomiast w grupie dzieci z zapaleniem mózgu różnice te nie były znaczące.

Sugeruje to, że zmniejszenie lokalnej produkcji CHI3L1 wiąże się z cięższym przebiegiem KZM u dzieci, a zwiększenie CHI3L1 w zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych może odzwierciedlać łagodniejszy przebieg choroby. Dodatkowo wykazano istotną korelację między większym spadkiem poziomu CHI3L1 w surowicy po dwóch tygodniach leczenia a silniejszym bólem głowy zgłaszanym przez pacjentów. Zaobserwowano również związek między większym spadkiem współczynnika CHI3L1 a dłuższym czasem przyjmowania mannitolu. Natomiast wartość indeksu CHI3L1 po leczeniu była istotnie skorelowana z krótszym okresem hospitalizacji.

7.4. Analiza związku CHI3L1 ze stężeniem cytokin zapalnych, integralnością bariery krew-mózg, odpowiedzią immunologiczną i ciężkością KZM u dzieci i młodzieży.

Poziomy CHI3L1 w płynie mózgowo-rdzeniowym dodatnio korelowały z innymi cytokinami prozapalnymi, takimi jak IL-6 , TNF- α i chemeryną, co podkreśla jego udział w pośredniczeniu w odpowiedziach zapalnych w OUN. U dzieci, u których zdiagnozowano zapalenie mózgu, Q-alb było wyższe w porównaniu z pacjentami z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych, co wskazuje na zwiększoną przepuszczalność BBB. Różnice we wskaźniku odpowiadają stopniowi uszkodzenia tej bariery. Macierz korelacji ujawniła, że poziomy i wartości indeksu CHI3L1 w surowicy dodatnio korelowały z Q-alb. Wśród cytokin płynu mózgowo-rdzeniowego stwierdzono silną dodatnią korelację między ilorazem albumin a IL-4, IL-6 i TNF- α.

8. Wnioski

1. W populacji północno-wschodniej Polski nierozpoznane bezobjawowe lub skąpoobjawowe zakażenia TBEV występują często, zarówno u dorosłych, jak i dzieci.

2. Odsetek mieszkańców obszaru endemicznego zaszczepionych przeciwko KZM jest niski i zdecydowana większość nie planuje tego szczepienia w przyszłości.

3. Kampanie informujące o zagrożeniach związanych z KZM mogą zwiększyć akceptację szczepień.

4. Białko CHI3L1 może ograniczać procesy zapalne w ośrodkowym układzie nerwowym w przebiegu KZM.

6. CHI3L1 jest obiecującym biomarkerem przebiegu KZM u dzieci.

7. Powikłania KZM mogą mieć związek z przedłużającymi się procesami patologicznymi w obrębie bariery krew-mózg.

9. Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy

9.1.Tick-borne encephalitis - a review of current epidemiology, clinical symptoms, management and prevention. Bojkiewicz E, Toczyłowski K, Sulik A. (2020). Przegląd Epidemiologiczny 74(2):316-325 doi: 10.32394/pe.74.24

https://doi.org/10.32394/pe.74.24

Ewa Bojkiewicz, Kacper Toczyłowski, Artur Sulik

TICK-BORNE ENCEPHALITIS – A REVIEW OF CURRENT EPIDEMIOLOGY, CLINICAL SYMPTOMS, MANAGEMENT, AND PREVENTION

KLESZCZOWE ZAPALENIE MÓZGU – PRZEGLĄD AKTUALNEJ EPIDEMIOLOGII, OBJAWÓW KLINICZNYCH, POSTĘPOWANIA I PROFILAKTYKI

Medical University of Bialystok, Department of Pediatric Infectious Diseases
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci

ABSTRACT

Tick-borne encephalitis virus (TBEV), which causes central nervous system infections, is a major health problem in Europe and Asia. This virus is transmitted mainly via the bite of a tick. However, an infection may also occur as a result of consuming raw milk. In 2018, a total of 3 092 cases of tick-borne encephalitis (TBE) were reported in EU countries. In recent years, TBE has emerged in previously unaffected regions; thus, new endemic areas have been identified. Most cases of TBE occur in spring and autumn, which correlates with increased tick activity. TBE is found in all age groups, including infants. The clinical presentation of TBE varies, but the severity of the infection and risk of complications increase with age. Post-encephalitic syndrome, which affects up to 50% of infected individuals, significantly reduces quality of life. Currently, there is no effective treatment for TBE, and supportive management is used in the acute phase of the disease. Therefore, anti-TBE immunization and the avoidance of tick bites are of key importance in preventing this infection.

Key words: *tick-borne encephalitis virus, tick-borne encephalitis, TBE, ticks*

STRESZCZENIE

CEL. Wirus kleszczowego zapalenia mózgu (KZM), powodujący zakażenia ośrodkowego układu nerwowego, jest istotnym problemem zdrowotnym w Europie i Azji. Wirus ten przenoszony jest głównie w następstwie wkłucia się kleszcza, chociaż zakażenie może być również skutkiem spożycia niepasteryzowanego mleka. W 2018 roku zgłoszono w krajach UE łącznie 3 092 przypadki zachorowań. W ostatnich latach obserwuje się rozszerzanie zasięgu występowania KZM oraz powstawania nowych terenów endemicznych wirusa. Większość przypadków zakażenia występuje w okresie wiosennym i jesiennym, co koreluje z najwyższą aktywnością kleszczy w tych porach roku. KZM stwierdzane jest w każdej grupie wiekowej, w tym u najmłodszych dzieci. Obraz kliniczny zakażenia jest zróżnicowany, ale ryzyko ciężkości przebiegu i trwałych powikłań po przechorowaniu KZM wzrasta wraz z wiekiem. Występujący u nawet 50% pacjentów zespół postencefalityczny istotnie obniża jakość życia chorych. Obecnie nie ma skutecznej metody leczenia KZM, a postępowanie w ostrym okresie choroby ma charakter wyłącznie objawowy. Z tego powodu kluczowe znaczenie w prewencji zakażenia mają szczepienia przeciwko KZM oraz działania profilaktyczne minimalizujące możliwość ukłucia przez kleszcza.

Słowa kluczowe: *wirus kleszczowego zapalenia mózgu, kleszczowe zapalenie mózgu, KZM, kleszcze*

INTRODUCTION

Tick-borne encephalitis (TBE) is a viral disease of the central nervous system caused by the RNA virus of the *Flaviviridae* family in the genus *Flavivirus*. This genus also includes West Nile fever virus, Dengue fever, yellow fever virus, Japanese encephalitis virus, and Zika virus. There are three main subtypes of tick-borne encephalitis virus (TBEV): Far Eastern, Siberian, and European. However, RNA viruses constantly mutate. Based on an analysis of the phylogenetic evolution of TBEV, two new subtypes were recently proposed: the Himalayan type, isolated in the Tibetan Plateau, and the Baikalian type, from the areas of Lake Baikal (1). TBE is endemic in Europe and Asia, ranging from eastern France to northern Japan (2-4). The occurrence of ticks and tick-borne diseases is constantly expanding to new areas. Over the past decades, an increasing number of reported cases has been observed (5,6). Vaccination against TBE among at-risk groups in Poland has been recommended since 1993, which led to a statistically significant decrease in the hospitalization of foresters and forest workers. At present, the majority of infections occur in people not professionally connected with forestry and tourists traveling to endemic areas, including children (7).

ETIOLOGY AND DIAGNOSTIC METHODS

In Europe, the primary viral vectors are ticks. The most important among them are the species *Ixodes ricinus* in Europe and *Ixodes persulcatus,* the latter of which occurs mainly in Russia. In Poland, 21 tick species have been described, among which two species are of the greatest importance: the common tick, *Ixodes ricinus*, and the meadow tick, *Dermacentor reticulatus* (8). Each development stage of this arachnid, from larva, to nymph, to adult, can be a vector of infection, and each needs a vertebrate's blood to develop. The entire tick development cycle lasts 2–4 years (9).

Human infections occur mainly through tick bites. The virus present in the saliva of the arthropod is transmitted to the skin, where it then penetrates the lymph nodes followed by the central nervous system (CNS). Infection is also possible as a result of raw milk consumption (10). The majority of infections with TBEV are asymptomatic (11). The symptomatic course of the disease includes mild aseptic meningitis, encephalitis, and myelitis (12). When the infection spreads to the CNS, the virus is usually no longer present in the blood or cerebrospinal fluid, which limits the use of molecular methods for TBE diagnosis. Although RT-PCR is a sensitive and specific method that allows the rapid diagnosis of flaviviral infections in humans, its effectiveness is only high in the acute phase of infection due

WSTĘP

Kleszczowe zapalenie mózgu (KZM) jest wirusową chorobą ośrodkowego układu nerwowego wywołaną przez wirusa RNA z rodziny *Flaviviridae*, rodzaju *Flavivirus*. Rodzaj ten obejmuje również m. in. wirusa gorączki Zachodniego Nilu, Dengi, żółtej gorączki, japońskiego zapalenia mózgu oraz wirusa Zika. Wyróżnia się trzy główne typy wirusa KZM: dalekowschodni, syberyjski oraz europejski. Wirusy te stale mutują. Na podstawie analizy ich ewolucji filogenetycznej zaproponowano wyodrębnienie nowych typów: typu himalajskiego z obszaru Wyżyny Tybetańskiej oraz typu bajkalskiego z obszarów jeziora Bajkał (1). KZM występuje endemicznie w wielu regionach Europy i Azji, sięgając od wschodnich terenów Francji po północną Japonię (2–4). Zasięg występowania kleszczy i przenoszonych przez nie chorób stale rozszerza się o nowe obszary. Na przestrzeni ostatnich dekad zaobserwowano rosnącą liczbę zgłaszanych przypadków KZM (5,6). Od 1993 roku w Polsce zaleca się szczepienie przeciwko KZM w grupach ryzyka, co pozwoliło na zdecydowane ograniczenie hospitalizacji w grupie leśników i pracowników leśnych. Obecnie większość zakażeń dotyczy osób zawodowo niezwiązanych z leśnictwem, turystów podróżujących do terenów endemicznych, a także dzieci (7).

ETIOLOGIA I METODY DIAGNOSTYCZNE

W Europie głównym wektorem wirusa są kleszcze. Dominującą rolę odgrywają gatunki takie jak *Ixodes ricinus* w Europie oraz *Ixodes persulcatus* występujący głównie w Rosji. W Polsce opisano 21 gatunków kleszczy, spośród których największe znaczenie mają dwa gatunki: kleszcz pospolity *Ixodes ricinus* i kleszcz łąkowy *Dermacentor reticulatus* (8). Każde stadium rozwojowe pajęczaka, począwszy od larwy, poprzez nimfę, aż do postaci dorosłej, może być wektorem infekcji oraz każde potrzebuje krwi kręgowca do rozwoju. Cały cykl rozwojowy kleszczy trwa 2-4 lata (9).

Do zakażenia człowieka dochodzi głównie wskutek wkłucia się kleszcza. Wirus obecny w ślinie stawonoga trafia do skóry, skąd drogami limfatycznymi przenika do węzłów chłonnych i dalej do ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Możliwe jest też zakażenie w wyniku spożywania niepasteryzowanego mleka (10). Większość zakażeń wirusem KZM przebiega bezobjawowo (11). Przebieg objawowy obejmuje łagodne aseptyczne zapalenie opon, zapalenie mózgu i zapalenie rdzenia (12). W fazie zajęcia OUN wirus przeważnie nie jest już obecny we krwi, ani w płynie mózgowo-rdzeniowym, co ogranicza zastosowanie metod molekularnych w diagnostyce KZM. Pomito the short duration of viremia or low viremia in the blood of infected patients (13). Therefore, the detection of specific antibodies is the basis for TBE diagnosis (14). When interpreting the results of serological tests, it should be taken into account that infections caused by *Flaviviridae* viruses induce the production of cross-reactive antibodies. This results in difficulties in the unequivocal interpretation of the obtained results. In addition, a past flavivirus infection significantly hinders diagnosis, which is of particular importance in regions where there are many antigenically associated flaviviruses (15). One of the major advances in the diagnosis of these infections was the development of multiplex tests that allow the simultaneous detection of antibodies directed against several flaviviruses. For this purpose, high-density microarrays containing peptides from various flaviviruses were developed. Microsphere-based immunoassays for measuring IgM and IgG directed against many types of flaviviruses are currently the method of choice for the diagnosis of TBE (15,16).

EPIDEMIOLOGY

TBE is a seasonal disease caused by the arachnid's activity in the months of April–October. The incidence of TBE peaks in spring (June and July) and autumn (September and October). In recent years, a worrying increase in the number of reported cases has been noted. In 2018, compared to the previous year, the number of reported cases of TBE doubled in Slovakia, Lithuania and Croatia and increased by approximately 20% in Germany (2). In 2016 in Netherlands the emergence of this disease was observed for the first time, while in French Alsace there was a threefold increase in the number of TBE infections (17,18). This observed increase is caused by multiple factors, including the growing awareness and detectability of infections, the spread of ticks to new areas, and an increase in the population of ticks. Observable climate changes—particularly milder winters and warmer summers—also facilitate tick survival (19).

TBE is endemic in Central and Eastern Europe, southern Russia, and in Scandinavia. In the European Union (EU), there are between 2000 to 4000 reported cases annually, 95% of which require hospitalization, and every hundredth patient dies (19). In 2018, a total of 3,092 cases were reported in EU countries, and 16 people died (0.6%). The number of countries reporting cases increased from 19 in 2012 to 26 in 2018. In 2018, the majority of cases occurred in the Czech Republic, Germany, Sweden, and Lithuania (Table 1) (2). Importantly, in the same year, 35.4% of all reported cases occurred in the Czech Republic and Lithuania, despite the fact that their total population represented

mo że RT-PCR jest czułą i specyficzną metodą, która pozwala na szybką diagnozę infekcji flawiwirusowej u ludzi, jej skuteczność jest wysoka jedynie w ostrej fazie infekcji, na co ma wpływ krótki czas utrzymywania się wiremii lub niski poziom wiremii we krwi zakażonych pacjentów (13). Dlatego podstawą rozpoznania KZM jest wykrycie swoistych przeciwciał (14). Interpretując wyniki badań serologicznych należy wziąć pod uwagę fakt, że infekcje spowodowane wirusami z rodziny *Flaviviridae* indukują wytwarzanie przeciwciał reagujących krzyżowo. Skutkuje to trudnościami w jednoznacznej interpretacji uzyskanych wyników, a przebyte w przeszłości zakażenie flawiwirusami znacznie utrudnia tę diagnostykę, co ma szczególne znaczenie w rejonach, w których występuje wiele flawiwirusów powiązanych antygenowo (15). Jednym z głównych postępów w dziedzinie diagnozowania tych zakażeń było opracowanie testów multipleksowych, które pozwalają na jednoczesne wykrycie przeciwciał skierowanych przeciwko kilku flawiwirusom. W tym celu opracowano mikromacierze o dużej gęstości zawierające peptydy pochodzące *z różnych* flawiwirusów. Oparte na mikrosferach testy immunologiczne do pomiaru IgM i IgG skierowane przeciwko wielu rodzajom flawiwirusów *są obecnie metodą z wyboru w diagnostyce* (15,16) w rejonach, gdzie istnieje ryzyko współzakażenia *różnymi* flawiwirusami.

EPIDEMIOLOGIA

KZM jest chorobą sezonową ze względu na aktywność pajęczaka w miesiącach kwiecień – październik. Zakażenia u ludzi charakteryzują się dwoma szczytami zachorowań: w okresie wiosennym (czerwiec, lipiec) i jesiennym (wrzesień, październik). Na przestrzeni ostatnich lat zauważono niepokojący wzrost liczby raportowanych przypadków. W 2018 roku, w porównaniu do roku poprzedniego, liczba zgłoszonych przypadków KZM podwoiła się na Słowacji, Litwie i Chorwacji, a w Niemczech wzrosła o blisko 20% (2). W Holandii w 2016 roku zaobserwowano pojawienie się tej choroby po raz pierwszy, podczas gdy na terenie Francji w rejonie Alzacji zanotowano aż trzykrotny wzrost liczby zakażenia KZM (17,18). Przyczyną obserwowanego wzrostu jest przypuszczalnie wiele czynników. Może on wynikać częściowo z rosnącej świadomości i wykrywalności zakażeń, rozprzestrzeniania się kleszczy na nowe obszary, a także zwiększenia się populacji kleszczy. Kierunek obserwowanych zmian klimatycznych, łagodniejsze zimy oraz cieplejsze lato ułatwiają kleszczom przeżycie (19).

Choroba występuje endemicznie w Europie Środkowej i Wschodniej, w południowej części Rosji oraz w Skandynawii. Rocznie w Unii Europejskiej (UE)

Table I. Number of cases and incidence per 100,000 inhabitants in selected EU countries.[a]
Tabela I. Liczba zachorowań oraz zapadalność/100 tys. mieszkańców w wybranych krajach EU.[a]

Country / Kraj	2014		2015		2016		2017		2018	
	Number of cases/ Liczba zachorowań	Incidence / Zapadalność/ 100 tys.	Number of cases/ Liczba zachorowań	Incidence / Zapadalność/ 100 tys.	Number of cases/ Liczba zachorowań	Incidence / Zapadalność/ 100 tys.	Number of cases/ Liczba zachorowań	Incidence / Zapadalność/ 100 tys.	Number of cases/ Liczba zachorowań	Incidence / Zapadalność/ 100 tys.
Austria/ Austria	81	1.0	79	0.9	95	1.1	123	1.4	170	1.9
Croatia Chorwacja/	23	0.5	26	0.6	6	0.1	10	0.2	24	0.5
Czech Republic/ Czechy	410	3.9	349	3.3	565	5.4	677	6.4	713	6.7
Estonia/ Estonia	82	6.2	115	8.7	80	6.1	84	6.4	85	6.4
Finland/ Finlandia	47	0.9	68	1.2	61	1.1	82	1.5	79	1.4
Lithuania/ Litwa	149	7.4	141	7.1	91	4.6	178	9.1	384	13.7
Latvia/ Łotwa	353	12.0	336	11.5	633	21.9	474	16.6	139	5.2
Germany/ Niemcy	264	0.3	220	0.3	347	0.4	485	0.6	583	0.7
Norway/ Norwegia	13	0.3	9	0.2	12	0.2	16	0.3	26	0.5
Poland/ Polska	131	0.3	115	0.3	211	0.6	196	0.5	197	0.4
Slovakia/ Słowacja	115	2.1	80	1.5	169	3.1	75	1.4	156	2.9
Slovenia/ Słowenia	100	4.9	62	3.0	83	4.0	102	4.9	153	7.4
Sweden/ Szwecja	178	1.8	268	2.7	238	2.4	365	3.7	385	3.5
Hungary/ Węgry	26	0.3	22	0.2	14	0.1	14	0.1	32	0.3

[a] Adapted from European Centre for Disease Prevention and Control. Tick-borne encephalitis. In: Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC; 2019
[a] źródło: European Centre for Disease Prevention and Control. Tick-borne encephalitis. W: Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC; 2019

only 2.7% of the population of the countries covered by this analysis.

According to data published in 2019 by the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), the majority of TBE cases occur in people between 45 and 64 years of age (1 120 cases, 0.8 per 100,000 people). In all age groups, approximately 60.6% of cases occurred in males, and the ratio of males to females was 1.5:1. The lowest incidence was recorded in children under 4 years of age (0.2 out of 100,000) (2). Notably, TBEV infections occur in all age groups,

notuje się od około 2 000 do 4 000 przypadków, z czego 95% zarejestrowanych przypadków wymaga hospitalizacji, a co setny pacjent umiera (19). W 2018 roku zgłoszono w krajach UE łącznie 3 092 przypadków zachorowań, 16 osób zmarło (0,6%). Liczba krajów raportujących przypadki zachorowań wzrosła z 19 w 2012 r. do 26 w 2018 r. W 2018 roku najwięcej przypadków wystąpiło na terenie Czech, Niemiec, Szwecji oraz Litwy (Tab. I) (2). Co istotne, w tym samym roku aż 35,4% wszystkich zgłoszonych przypadków wystąpiło w Czechach i na Litwie, pomimo że łączna liczba including infants (20). The difference in the frequency of TBE in different age groups is not due to different susceptibility levels to the infection but likely due to the effect of each group's preferred everyday activities, types of rest, and working conditions, which all determine one's exposure to tick bites (19).

The number of TBE infections has been registered in Poland since 1970. In the years 2000–2015, a total of 3,662 cases of TBE (0.33–0.92/100,000 inhabitants) were recorded in Poland (10). The highest number of cases, nearly 50%, was reported in Podlaskie (6.17/100,000 people) and the Warmian–Masurian voivodeships (1.75/100,000 people). Currently, according to the reports of regional sanitary–epidemiological stations, on average, 200–300 cases of TBE are registered in Poland annually. In 2019, the incidence rate of TBE for Poland was 0.69/100,000 inhabitants (21). According to environmental investigations and serological surveys, TBE presumably occurs all over Poland (22,23). Compared to north-eastern Poland, more CNS inflammations of an undetermined etiology are recorded in the voivodeships located in the south-western and south-eastern parts of the country (24). It can, therefore, be assumed that some of the undefined neuroinfections are, in fact, undiagnosed TBE cases. This is especially probable because the incidence of TBE is statistically significantly higher in the immediate vicinity of the southern regions of Poland, the Czech Republic, and Slovakia (about 6.4/100,000). In addition, the reasons for underestimating the number of TBE cases may include an atypical course of the disease, limited access to diagnostics, and, unfortunately, neglecting to report cases of infection (25).

TREATMENT

The medical care of TBEV patients consists of symptomatic treatment. In milder cases, the administration of antipyretic, analgesic, antiemetic, and antiedema drugs, as well as the management of electrolytes (hyponatraemia) and acid-base imbalances, is required (26). There are no clearly defined treatment methods or guidelines. The lack of consensus regarding the duration of treatment and doses of drugs forces doctors to introduce their own approaches. According to our own experience, the use of dexamethasone in children with severe TBE at a dose of up to 0.6 mg/kg/day (maximum 16 mg/day) in four divided doses over 2–5 days tapered over 1–2 days produces beneficial therapeutic effects. Individual courses of treatment for patients with analgosedation, hyperventilation, hypothermia, decompressive hemicraniectomy, and intravenous immunoglobulins have also been described (27). Although antiviral therapies are currently not applicable in clinical practice, many in vitro studies offer the pos-

ludności w tych krajach reprezentowała tylko 2,7% populacji krajów objętych analizą.

Według danych opublikowanych w 2019 roku przez Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC), zakażenie wirusem KZM najczęściej jest obserwowane u osób między 45 a 64 rokiem życia (1 120 przypadków; 0,8 na 100 000 ludności). We wszystkich grupach wiekowych około 60,6% przypadków stanowili mężczyźni, a stosunek płci męskiej do żeńskiej wynosił 1,5:1. Najniższą zapadalność odnotowano wśród dzieci poniżej 4 roku życia (0,2 na 100 000) (2). Na uwagę zasługuje jednak fakt, że zakażenia wirusem KZM stwierdzane są w każdej grupie wiekowej, w tym u niemowląt (20). Zróżnicowanie częstości występowania zakażeń w różnych grupach wiekowych nie wynika z odmiennej podatności na zakażenie. Jest to raczej efekt preferowanej aktywności, warunków pracy i wybieranej formy odpoczynku, które warunkują ekspozycję na atak kleszcza (19).

Liczba zakażeń KZM jest rejestrowana w Polsce od 1970 roku. W latach 2000-2015 w Polsce odnotowano łącznie 3 662 zachorowania na KZM (0,33-0,92/100 000 mieszkańców)(10). Największą liczbę zachorowań zgłoszono w województwie podlaskim (6,17/100 000 osób) i warmińsko-mazurskim (1,75/100 000 osób), gdzie zanotowano około 50% wszystkich zachorowań w Polsce. Obecnie według raportów regionalnych stacji epidemiologicznych średnio w całej Polsce rejestruje się rocznie 200-300 przypadków KZM. W 2019 roku stwierdzono zapadalność 0,69/100 000 mieszkańców (21). Według serologicznych badań przesiewowych oraz matematycznej analizy uwarunkowań ekologicznych, KZM przypuszczalnie występuje w całej Polsce (22,23). W porównaniu do północno-wschodniej Polski, w województwach położonych w częściach południowo-zachodniej i południowo-wschodniej notuje się więcej zapaleń mózgu o nieokreślonej etiologii(24). Można więc założyć, że część nieokreślonych neuroinfekcji stanowią niezdiagnozowane KZM. Jest to tym bardziej prawdopodobne, że w bezpośrednim sąsiedztwie południowych regionów Polski, w Czechach i na Słowacji, zapadalność na KZM jest istotnie wyższa (około 6,4/100 000). Ponadto, przyczyn niedoszacowania liczby przypadków KZM można się dopatrywać w niecharakterystycznym przebiegu choroby, ograniczonym dostępie do diagnostyki oraz, niestety, w zaniedbaniu obowiązku zgłaszania przypadków infekcji przez lekarzy(25).

LECZENIE

Leczenie neuroinfekcji wywołanej wirusem KZM ma charakter objawowy. W przypadkach o lżejszym przebiegu wymagane jest podawanie leków przeciwgorączkowych, przeciwbólowych, przeciwwysibility to change this status quo. Efavirenz and tipranavir (currently used to treat HIV), dasabuvir (used to treat HCV), benzavir-2, and flavonoids derived from the roots of the Baikal skullcap (*Scutellaria baicalensis*) are the most promising substances that show anti-TBE activities (28-30).

COMPLICATIONS AND LONG-TERM CONSEQUENCES OF TBEV INFECTIONS

Recovery from TBE occurs within a few days or weeks. The severe course of the acute phase of infection carries the risk of permanent neurological complications, observed in up to 50% of patients (11). The most common of these are cranial and peripheral nerve paralysis and palsy, damage to the brachial plexus and cerebellum, abnormal EEG, and neuropsychological disorders (7). The latter include depression; characteropathy; chronic fatigue; muscle and joint pain; headache and dizziness; learning and working difficulties; difficulty concentrating, remembering, and learning; sleep disorders; and changes in eating habits. TBE infection also increases the likelihood of developing dementia in later years. These nonspecific and poorly understood symptoms are called post-encephalitic syndrome (PES) (31). PES symptoms significantly reduce the patient's quality of life and sometimes force a change in lifestyle.

The reason for the diversity in the course of TBE infection remains unknown. It has been observed that the course of infection is more severe in adults and that the risk of permanent complications after the illness increases with age (32). Recent studies showed that the clinical variability of the disease is linked to the individual differences in the immune cell accumulation patterns, mainly varying counts of B, Th CD4+, Tc CD8+ lymphocytes, and different cytokine response (33,34).

Severe complications of TBE in children occur about 10 times less often than in adults. The data on the pediatric population collected so far describe the course and long-term effects of this infection in children only to a limited extent. A Swedish study of 55 children suffering from TBE in 2004–2008 showed that about 75% experienced chronic headaches, increased fatigue, excessive irritability, difficulty concentrating, and memory problems within 2 to 7 years after the infection (35). Importantly, in a recent Polish study, TBEV was the second most common cause of pediatric CNS infections causing as much as 9% and 31% of all meningitis and encephalitis cases, respectively (36). The annual incidence of TBE in children was estimated to 4.08 (95% CI, 2.07–8.02) per 100,000. Assuming wide-spread distribution of TBE in Poland (22,23), many pediatric TBE cases in Poland remain

miotnych, przeciwobrzękowych oraz wyrównywanie zaburzeń elektrolitowych (hiponatremia) i kwasowo -zasadowych (26). Nie istnieją jasno określone zasady leczenia oraz standardy postępowania. Brak konsensusu dotyczącego czasu leczenia i dawek stosowanych leków skutkuje tym, że wszystkie stosowane metody mają charakter autorski. Według doświadczeń własnych stosowanie deksametazonu u dzieci z ciężkim przebiegiem KZM w dawce do 0,6 mg/kg/dobę (maksymalnie 16 mg/dobę) w 4 dawkach podzielonych przez 2-5 dni ze stopniową redukcją dawki przez 1-2 dni przynosi korzystne efekty terapeutyczne. Opisano *również pojedyncze* próby leczenia chorych za pomocą analgosedacji, hiperwentylacji, hipotermii, dekompresyjnej hemikraniektomii, a także dożylnych immunoglobulin (27). Pomimo *że* terapie przeciwwirusowe nie mają obecnie zastosowania w praktyce klinicznej, wiele badań *in vitro* daje nadzieje na zmianę tego stanu. Najbardziej obiecującymi substancjami, dla których w badaniach *in vitro* wykazano działanie przeciw wirusowi KZM są efavirenz oraz tipranavir (obecnie stosowane w leczeniu HIV), dasabuvir (używany w leczeniu HCV), benzavir-2 oraz flawonoidy pozyskiwane z korzeni tarczycy bajkalskiej (*Scutellaria baicalensis*) (28–30).

POWIKŁANIA I ODLEGŁE NASTĘPSTWA ZAKAŻENIA KZM

Powrót do zdrowia po przechorowaniu KZM następuje w ciągu kilku dni lub tygodni. Ciężki przebieg ostrej fazy zakażenia niesie ryzyko pozostawienia trwałych powikłań neurologicznych, obserwowanych nawet u 50% pacjentów (11). Najczęstszymi z nich są porażenia oraz niedowłady nerwów czaszkowych i obwodowych, uszkodzenie splotu barkowego, móżdżku, nieprawidłowe EEG, a także zaburzenia neuropsychologiczne (7). Te ostatnie obejmują swoim spektrum depresję, charakteropatię, przewlekłe zmęczenie, bóle mięśni i stawów, bóle i zawroty głowy, trudności w nauce i pracy, trudności z koncentracją uwagi, zapamiętywania oraz uczenia się, zaburzenia snu i zmiany nawyków żywieniowych. Zakażenie wirusem KZM zwiększa także prawdopodobieństwo wystąpienia demencji w późniejszym wieku. Te niespecyficzne i trudne do uchwycenia objawy ujęto pod nazwą tzw. zespołu postencefalicznego (*post-encephalitic syndrome*, PES) (31). Objawy PES istotnie obniżają jakość życia chorego oraz niekiedy wymuszają zmianę stylu życia.

Przyczyna zróżnicowania przebiegu zakażenia wirusem KZM pozostaje nieznana. Zaobserwowano, że przebieg zakażenia jest cięższy u dorosłych, a ryzyko trwałych powikłań po przechorowaniu KZM wzrasta wraz z wiekiem (32). Zasadniczy wpływ na przebieg unrecognized. These disturbing facts clearly indicate the need to continue research into the incidence and long-term effects of TBE in children.

PREVENTION

An important element of TBE prevention is avoiding tick bites by wearing appropriate clothing and using effective repellents. However, protection against tick bites cannot replace vaccination, which is the most effective method of preventing TBE. Two vaccines containing inactivated virus strains are currently available in Europe. After a full 3-dose vaccination course, 96–99% of those who are vaccinated develop immunity (37). The Austrian example demonstrates the effectiveness of vaccination in gaining control over TBE. In Austria, thanks to the large information campaigns that have been ongoing since the beginning of the 1980s, the rates of vaccination against TBE in some regions have reached 95%, while the number of cases has decreased from several hundred to about 50–100 per year (38).

Because of the genetic similarities between flaviviruses, the immune response to vaccination or infection with one flavivirus is modulated by immunological memory and the production of antibodies after previous contact with other flaviviruses. This phenomenon is named the *original antigenic sin* (39). Cross-reactive circulating antibodies that are produced in response to one virus type do not protect against the other types of the virus. Instead, they contribute to antibody-mediated strengthening of the infection, which is particularly important in dengue fever (40). They can also negatively influence the effectiveness of vaccination against TBE (41). An increased production of cross-reactive non-neutralizing IgG antibodies was also observed during infection with Zika virus in individuals previously vaccinated against TBE (42). Due to the rapid spread of flaviviruses, the impact of flavivirus infection on the course of subsequent infections with other species and the effectiveness of vaccination require further research.

SUMMARY

The potentially severe course of infection and the risk of permanent neurological complications make TBE an important health problem in Europe. Many aspects of this infection are still not fully understood, and prevention is currently the only effective way of fighting it.

KZM ma nie tyle zjadliwość samego wirusa, co prawdopodobnie reakcja układu odpornościowego osoby zakażonej. U osób z ciężkim oraz łagodnym przebiegiem zakażenia wirusem KZM obserwowano różnice w liczbie limfocytów B, Th CD4+, Tc CD8+ oraz w stężeniach cytokin i chemokin (33,34).

Poważne powikłania KZM wśród dzieci są opisywane około 10 razy rzadziej, niż u osób dorosłych. Dotychczas zebrane dane dotyczące populacji pediatrycznej jedynie pobieżnie opisują przebieg, jak i odległe skutki zakażenia u dzieci, a informacje na temat odległych następstw zakażenia u dzieci są ograniczone. Badania przeprowadzone w Szwecji obejmujące 55 dzieci chorujących w latach 2004-2008 na KZM wykazały, że około 75% z nich doświadczało przewlekłych bólów głowy, wzmożonej męczliwości, nadmiernej drażliwości oraz trudności z koncentracją i funkcjonowaniem pamięci w przeciągu 2 do 7 lat po infekcji (35). Według najnowszego polskiego badania KZM jest drugą najczęstszą przyczyną zakażeń OUN w populacji pediatrycznej w województwie podlaskim. Wirus KZM był odpowiedzialny za aż 9% przypadków zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych i 31% wszystkich przypadków zapalenia mózgu (36). Roczną zapadalność wśród dzieci poniżej 18 r.ż. oszacowano na 4.08 (95% CI, 2,07–8,02) przypadków na 100 000 dzieci. Jeżeli zgodnie z szacunkami *Stefanoff* i wsp (22,23) zakażenia KZM są w Polsce znacznie bardziej rozpowszechnione, to duża część zakażeń wśród dzieci pozostaje nierozpoznana. Te niepokojące fakty jednoznacznie wskazują na potrzebę kontynuacji badań nad częstością występowania i odległymi skutkami KZM u dzieci.

PROFILAKTYKA

Ważnym elementem profilaktyki KZM jest unikanie ataków kleszczy przez zakładanie odpowiedniej odzieży i stosowanie skutecznych repelentów. Ochrona przed kleszczami nie zastąpi jednak szczepień, które są najskuteczniejszą metodą prewencji KZM. W Europie dostępne są obecnie dwie szczepionki zawierającego inaktywowane szczepy wirusa. Po pełnym 3-dawkowym cyklu szczepienia 96-99% zaszczepionych wytwarza odporność (37). Skuteczności szczepień w uzyskaniu kontroli nad KZM w populacji dowodzi przykład austriacki. W Austrii dzięki szeroko zakrojonej kampanii informacyjnej prowadzonej od początku lat ’80-tych, wyszczepialność przeciwko KZM sięga w niektórych regionach 95%, a liczba zachorowań zmniejszyła się z kilkuset do około 50-100 rocznie (38).

Pokrewieństwo genetyczne flawiwirusów sprawia, że reakcja odpornościowa na szczepienie lub zakażenie jednym flawiwirusem jest modulowana przez pamięć immunologiczną i produkcję przeciwciał po poprzednich kontaktach z innymi flawiwirusami. Zjawisko to nazwano „pierwotnym grzechem antygenowym" (ang. o*riginal antigenic sin*) (39). Krążące przeciwciała reaktywne krzyżowo powstałe w odpowiedzi na jeden rodzaj wirusa nie chronią jednak przed zakażeniem innymi typami wirusa. Wprost przeciwnie, przyczyniają się do antygenowego wzmocnienia zakażenia, które jest szczególnie istotne w dendze (40). Mogą także negatywnie wpływać na skuteczność szczepień przeciwko KZM (41). Z kolei u osób uprzednio zaszczepionych przeciwko KZM, zakażenie wirusem Zika powodowało zwiększenie miana nieneutralizujących przeciwciał IgG reagujących krzyżowo (42). Wobec gwałtownego rozprzestrzeniania się flawiwirusów, wpływ zakażenia nimi na przebieg kolejnych zakażeń innymi gatunkami i skuteczność szczepień jest zjawiskiem wymagającym dalszych badań.

PODSUMOWANIE

Potencjalnie ciężki przebieg zakażenia oraz ryzyko trwałych powikłań neurologicznych powoduj*ą, że zakażenie wirusem KZM* stanowi ważny problem zdrowotny w Europie. Wiele aspektów dotyczących zakażenia pozostaje jak dotąd nie w pełni poznanych**.** Profilaktyka stanowi obecnie jedyny skuteczny sposób walki z zakażeniem.

REFERENCES

1. Michelitsch A, Wernike K, Klaus C, et al. Exploring the Reservoir Hosts of Tick-Borne Encephalitis Virus. Viruses 2019;11. https://doi.org/10.3390/v11070669.
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Tick-borne encephalitis. Stockholm: ECDC. Annual epidemiological report for 2018; 2019.
3. Yoshii K. Epidemiology and pathological mechanisms of tick-borne encephalitis. J Vet Med Sci 2019;81:343–7. https://doi.org/10.1292/jvms.18-0373.
4. Pukhovskaya NM, Morozova OV, Vysochina NP, et al. Tick-borne encephalitis virus in arthropod vectors in the Far East of Russia. Ticks Tick Borne Dis 2018;9:824–33. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.01.020.
5. Kříž B, Fialová A, Šebestová H, et al. Comparison of the epidemiological patterns of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in the Czech Republic in 2007-2016. Epidemiol Mikrobiol Imunol 2018;67:134–40.
6. Garcia-Vozmediano A, Krawczyk AI, Sprong H, et al. Ticks climb the mountains: ixodid tick infestation and infection by tick-borne pathogens in the Western Alps. Ticks and Tick-Borne Diseases 2020:101489. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101489.
7. Arnež M, Avšič-Županc T. Tick-borne encephalitis in children: an update on epidemiology and diagnosis. Expert Review of Anti-Infective Therapy 2009;7:1251–60. https://doi.org/10.1586/eri.09.99.
8. Przygodzka M, Mikulak E, Chmielewski T, et al. Repellents as a major element in the context of prevention of tick-borne diseases. Przegl Epidemiol 2019:269–80. https://doi.org/10.32394/pe.73.25.
9. Kunze U. The International Scientific Working Group on Tick-Borne Encephalitis (ISW TBE): Review of 17 years of activity and commitment. Ticks and Tick-Borne Diseases 2016;7:399–404. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.12.018.
10. Król ME, Borawski B, Nowicka-Ciełuszecka A, et al. Outbreak of alimentary tick-borne encephalitis in Podlaskie voivodeship, Poland. Przegl Epidemiol 2019:239–48. https://doi.org/10.32394/pe.73.01.
11. Kaiser R. Tick-borne encephalitis. Infect Dis Clin North Am 2008;22:561–75, x. https://doi.org/10.1016/j.idc.2008.03.013.
12. Bogovic P, Strle F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. World J Clin Cases 2015;3:430–41. https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i5.430.
13. Saksida A, Duh D, Lotric-Furlan S, et al. The importance of tick-borne encephalitis virus RNA detection for early differential diagnosis of tick-borne encephalitis. J Clin Virol 2005;33:331–5. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.07.014.
14. Lindquist L. Tick-borne encephalitis. Handbook of Clinical Neurology, vol. 123, Elsevier; 2014, p. 531–59. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53488-0.00025-0.
15. Musso D, Desprès P. Serological Diagnosis of Flavivirus-Associated Human Infections. Diagnostics (Basel) 2020;10. https://doi.org/10.3390/diagnostics10050302.
16. Mishra N, Caciula A, Price A, et al. Diagnosis of Zika Virus Infection by Peptide Array and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. MBio 2018;9. https://doi.org/10.1128/mBio.00095-18.
17. de Graaf JA, Reimerink JH, Voorn GP, et al. First human case of tick-borne encephalitis virus infection acquired in the Netherlands, July 2016 [published correction appears in Euro Surveill. 2016 Aug 25;21(34):]. *Euro Surveill*. 2016;21(33):30318. doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.33.30318
18. Beauté J, Spiteri G, Warns-Petit E, et al. Tick-borne encephalitis in Europe, 2012 to 2016. Euro Surveill 2018;23. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.45.1800201.

19. Zeman P. Prolongation of Tick-Borne Encephalitis Cycles in Warmer Climatic Conditions. International Journal of Environmental Research and Public Health 2019;16:4532. https://doi.org/10.3390/ijerph16224532.
20. Steffen R. Tick-borne encephalitis (TBE) in children in Europe: Epidemiology, clinical outcome and comparison of vaccination recommendations. Ticks and Tick-Borne Diseases 2019;10:100–10. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.08.003.
21. Czarkowski MP, Cielebąk E, Kondej B, et al. Infectious diseases and poisonings in Poland in 2019 - preliminary data. Warsaw: National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene Department of Epidemiology and Surveillance of Infectious Diseases and Chief Sanitary Inspectorate – Department of Epidemic Prevention and Border Sanitary Protection; 2020.
22. Stefanoff P, Rubikowska B, Bratkowski J, et al. Predictive Model Has Identified Tick-Borne Encephalitis High-Risk Areas in Regions Where No Cases Were Reported Previously, Poland, 1999-2012. Int J Environ Res Public Health 2018;15. https://doi.org/10.3390/ijerph15040677.
23. Stefanoff P, Siennicka J, Kaba J, et al. Identification of new endemic tick-borne encephalitis foci in Poland – a pilot seroprevalence study in selected regions. International Journal of Medical Microbiology 2008;298:102–7. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.04.002.
24. Czarkowski MP, Cielebąk E, Kondej B, et al. Infectious diseases and poisonings in Poland in 2018. Warsaw: National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene Department of Epidemiology and Surveillance of Infectious Diseases and Chief Sanitary Inspectorate – Department of Epidemic Prevention and Border Sanitary Protection; 2019.
25. Drelich A, Kruszyński P, Wąsik TJ. Etiopatogeneza kleszczowego zapalenia mózgu (KZM). ANNALES ACADEMIAE MEDICAE SILESIENSIS n.d.:12.
26. Riccardi N, Antonello RM, Luzzati R, et al. Tick-borne encephalitis in Europe: a brief update on epidemiology, diagnosis, prevention, and treatment. European Journal of Internal Medicine 2019;62:1–6. https://doi.org/10.1016/j.ejim.2019.01.004.
27. Taba P, Schmutzhard E, Forsberg P, et al. EAN consensus review on prevention, diagnosis and management of tick-borne encephalitis. Eur J Neurol 2017;24:1214-e61. https://doi.org/10.1111/ene.13356.
28. Leonova GN, Shutikova AL, Lubova VA, et al. Inhibitory Activity of Scutellaria baicalensis Flavonoids against Tick-Borne Encephalitis Virus. Bull Exp Biol Med 2020;168:665–8. https://doi.org/10.1007/s10517-020-04776-y.
29. Stefanik M, Valdes JJ, Ezebuo FC, et al. FDA-Approved Drugs Efavirenz, Tipranavir, and Dasabuvir Inhibit Replication of Multiple Flaviviruses in Vero Cells. Microorganisms 2020;8:599. https://doi.org/10.3390/microorganisms8040599.
30. Gwon Y-D, Strand M, Lindqvist R, i in. Antiviral Activity of Benzavir-2 against Emerging Flaviviruses. Viruses 2020;12:351. https://doi.org/10.3390/v12030351.
31. Więdłocha M, Marcinowicz P, Stańczykiewicz B. Psychiatric Aspects of Herpes Simplex Encephalitis,Tick-Borne Encephalitis and Herpes Zoster EncephalitisAmong Immunocompetent Patients. Adv Clin Exp Med 2015;24:361–71. https://doi.org/10.17219/acem/40460.
32. Haglund M, Günther G. Tick-borne encephalitis—pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. Vaccine 2003;21:S11–8. https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00811-3.
33. Toczylowski K, Grygorczuk S, Osada J, et al. Evaluation of cerebrospinal fluid CXCL13 concentrations and lymphocyte subsets in tick-borne encephalitis. Int J Infect Dis 2020. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.01.023.
34. Grygorczuk S, Osada J, Toczyłowski K, et al. The lymphocyte populations and their migration into the central nervous system in tick-borne encephalitis. Ticks and Tick-Borne Diseases 2020;11:101467. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101467.
35. Fowler A, Forsman L, Eriksson M, et al. Tick-Borne Encephalitis Carries a High Risk of Incomplete Recovery in Children. vol. 163. 2013. https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.01.037.
36. Toczylowski K, Bojkiewicz E, Barszcz M, et al. Etiology, Clinical Presentation and Incidence of Infectious Meningitis and Encephalitis in Polish Children. Journal of Clinical Medicine 2020;9:2324. https://doi.org/10.3390/jcm9082324.
37. Schosser R, Reichert A, Mansmann U, et al. Irregular tick-borne encephalitis vaccination schedules: the effect of a single catch-up vaccination with FSME-IMMUN. A prospective non-interventional study. Vaccine 2014;32:2375–81. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.01.072.
38. Kunze U, Böhm G. [Tick-borne encephalitis (TBE) and TBE-vaccination in Austria: Update 2014]. Wien Med Wochenschr 2015;165:290–5. https://doi.org/10.1007/s10354-015-0362-9.
39. Monto AS, Malosh RE, Petrie JG, et al. The Doctrine of Original Antigenic Sin: Separating Good From Evil. J Infect Dis 2017;215:1782–8. https://doi.org/10.1093/infdis/jix173.
40. Slon Campos JL, Mongkolsapaya J, Screaton GR. The immune response against flaviviruses. Nat Immunol 2018;19:1189–98. https://doi.org/10.1038/s41590-018-0210-3.

41. Bradt V, Malafa S, von Braun A, i in. Pre-existing yellow fever immunity impairs and modulates the antibody response to tick-borne encephalitis vaccination. NPJ Vaccines 2019;4:38. https://doi.org/10.1038/s41541-019-0133-5.
42. Malafa S, Medits I, Aberle JH, i in. Impact of flavivirus vaccine-induced immunity on primary Zika virus antibody response in humans. PLoS Negl Trop Dis 2020;14:e0008034. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008034.

Received: 14.08.2020
Accepted for publication: 11.10.2020
Otrzymano: 14.08.2020 r.
Zaakceptowano do publikacji: 11.10.2020 r.

Address for correspondence:
Adres do korespondencji:
Assoc. prof. Artur Sulik, MD, PhD,
Medical University of Bialystok,
Department of Pediatric Infectious Diseases,
ul. Waszyngtona 17, 15-274 Bialystok
e-mail: artur.sulik@umb.edu.pl

9.2. The Prevalence of Asymptomatic Infections with Tick-Borne Encephalitis Virus and Attitude towards Tick-Borne Encephalitis Vaccine in the Endemic Area of Northeastern Poland. Bojkiewicz E, Toczylowski K, Grygorczuk S, Zelazowska-Rutkowska B, Dunaj J, Zebrowska A, Czupryna P, Moniuszko-Malinowska A, Sulik A. (2022). Vaccines (Basel) 10(8):1294 doi: 10.3390/vaccines10081294

vaccines

Article

The Prevalence of Asymptomatic Infections with Tick-Borne Encephalitis Virus and Attitude towards Tick-Borne Encephalitis Vaccine in the Endemic Area of Northeastern Poland

Ewa Bojkiewicz [1], Kacper Toczylowski [1], Sambor Grygorczuk [2], Beata Zelazowska-Rutkowska [3], Justyna Dunaj [2], Agnieszka Zebrowska [4], Piotr Czupryna [2], Anna Moniuszko-Malinowska [2] and Artur Sulik [1,*]

1 Department of Pediatric Infectious Diseases, Medical University of Bialystok, Waszyngtona 17, 15-274 Bialystok, Poland
2 Department of the Infectious Diseases and Neuroinfections, Medical University of Bialystok, Żurawia 14, 15-540 Bialystok, Poland
3 Department of Pediatric Laboratory Diagnostics, Medical University of Bialystok, Waszyngtona 17, 15-274 Bialystok, Poland
4 Regional Centre of Transfusion Medicine in Bialystok, Marii Skłodowskiej-Curie 23, 15-950 Bialystok, Poland
* Correspondence: artur.sulik@umb.edu.pl; Tel.: +48-857450685

check for updates

Citation: Bojkiewicz, E.; Toczylowski, K.; Grygorczuk, S.; Zelazowska-Rutkowska, B.; Dunaj, J.; Zebrowska, A.; Czupryna, P.; Moniuszko-Malinowska, A.; Sulik, A. The Prevalence of Asymptomatic Infections with Tick-Borne Encephalitis Virus and Attitude towards Tick-Borne Encephalitis Vaccine in the Endemic Area of Northeastern Poland. *Vaccines* **2022**, *10*, 1294. https://doi.org/10.3390/vaccines10081294

Academic Editor: Giuseppe La Torre

Received: 27 June 2022
Accepted: 8 August 2022
Published: 10 August 2022

Abstract: In Poland, tick-borne encephalitis (TBE) vaccination rate is low despite high incidence of severe infections with TBE virus (TBEV). However, infection with TBEV can be asymptomatic or mild, which makes the total number of cases difficult to assess. We aimed at assessing asymptomatic TBEV infections and describing attitudes towards the TBE vaccine. We studied 298 healthy adult blood donors and 180 children from the TBE endemic area of northeastern Poland for the presence of anti-TBEV IgG antibodies. We also surveyed a separate cohort of 444 adults. Thirty-eight blood donors (13%) and 38 survey respondents (9%) reported a history of a prior anti-TBEV vaccination. Forty respondents (9%) reported vaccinating their child in the past. Fourteen unvaccinated blood donors (5%) and four children (2%) were seropositive for specific anti-TBEV antibodies, suggesting a history of an undiagnosed TBEV infection. In the surveyed cohort, 130 (32%) expressed their intention to be vaccinated and 144 (36%) expressed their intention to vaccinate their child. This intention was significantly higher in respondents with a recent tick-bite, a diagnosis of tick-borne disease in a close relative, and in males. Our study shows that asymptomatic TBEV infections are common. The acceptance of TBE vaccine is low, but might be increased by communicating risks associated with tick bites.

Keywords: tick-borne encephalitis virus; tick-borne encephalitis; seroprevalence; blood donors; TBEV vaccination; Poland

1. Introduction

Tick-borne encephalitis (TBE) is an acute central nervous system (CNS) infection caused by tick-borne encephalitis virus (TBEV), transmitted to humans mainly by *Ixodes* spp. ticks. The disease is endemic in large areas of the moderate climate zone of Europe and Asia, with over 10,000 cases of the disease reported annually [1,2]. In Poland, the rate of diagnosed cases is 200–300 per year, about half of the cases from Podlaskie voivodeship in northeastern parts of the country, with local annual morbidity ranging from 4.45 to 9.16 per 100,000 inhabitants in 2019–2021 [3]. The estimated ECDC incidence rates for 2012–2016 in Lithuania, Latvia and Estonia were 15.6, 9.5 and 8.7 cases per 100,000 inhabitants, respectively [4]. The reported morality rate caused by the European type of TBE is around 1% and it is comparable in all European countries [5]. The fraction of TBEV-infected *Ixodes ricinus* ticks in this region has been found to be 0.21% and up to

0.42% locally, similar to the rates found in other recognized TBE endemic areas across Europe [6]. According to serological and molecular studies, currently TBEV is the only *Flavivirus* causing CNS infections in Poland [7–10]. The clinical severity of TBE varies, ranging from asymptomatic infections to severe encephalitis or myelitis, depending on the not fully understood combination of host and pathogen factors [2,11,12]. The CNS involvement is typically preceded by a distinct peripheral phase dominated by unspecific febrile illness. The second, neurologic phase may take the form of meningitis (with fever, meningeal signs and cerebrospinal fluid—CSF—pleocytosis), meningoencephalitis of variable severity or meningoencephalomyelitis. Usually, patients are hospitalized and the diagnosis is established during the second phase [11,13,14]. However, the background IgG-seropositivity found in healthy non-vaccinated persons from the endemic areas is common and has been attributed to a high number of undiagnosed mild or asymptomatic infections evading hospitalization and correct diagnosis [15,16]. It is difficult to determine the most typical presentation of the non-diagnosed cases. It is unclear whether they are truly asymptomatic or simply too mild and too unspecific to prompt diagnostics toward TBE. However, a study by Lotrič-Furlan suggests that unspecific flu-like febrile disease caused by TBEV is rare and most of the unrecognized cases are asymptomatic [17]. The exact rate and presentation of such cases is difficult to assess, but may be important for the proper understanding of both epidemiology and pathogenesis of the disease. Identification of persons with mild TBEV infections would be informative for the study of the disease pathogenesis and would increase knowledge of the predisposing and protective factors, both genetic and environmental.

Nevertheless, the burden of severe TBE cases in endemic areas is considerable [5]. Follow-up studies after TBE infection showed that up to 46% of patients experience incomplete recovery and report neurological sequalae such as cranial nerve paresis, hemiparesis, paraparesis, impaired balance, coordination, memory and concentration, and reduced stress tolerance [5,18]. In Italy it was confirmed that 1.6% of patients were admitted to intensive care unit due to TBE sequalae [19]. Additionally, due to the absence of any etiological treatment and increasing TBE burden estimated with DALYs, which reflect lost years of healthy life as well as mortality directly, this disease is an increasingly worrying public health problem across the world [20]. The WHO recommends immunizing with the TBE vaccine all individuals living in the area where the disease is common. There are four types of TBE vaccines around the world. Two of them are produced in Russia and are based on Far Eastern TBEV strains. Two other vaccines are based on European subtype TBEV strains [5]. Despite the high prevalence of TBEV infections in Poland, the vaccine uptake remains low. According to the Polish National Institute of Public Health, over the period of 10 years, from 2011 to 2020, only 419,408 individuals in Poland have been vaccinated with TBE vaccines, which constitutes around 1.1% of the total population [3]. The recognition of attitudes towards the TBE vaccine would help overcome vaccine hesitancy in the population in this endemic area. Therefore, the aims of this study were to assess the rate of asymptomatic infections by measuring the seroprevalence of anti-TBE antibodies and to evaluate the attitude towards the TBE vaccine in the population of a highly endemic TBE area in northeastern Poland.

2. Materials and Methods

2.1. The Prevalence of Anti-TBEV IgG

We examined the presence of anti-TBEV IgG antibodies in a serum sample from the venous blood of adults and children with no active TBEV infection. The adult study group consisted of 300 subjects. Adult subjects were heathy blood donors seen at the Regional Centre of Transfusion Medicine in Bialystok, Poland. Active infections, including type C hepatitis, were excluded before a donation, as a part of a standard qualification procedure. Each participant completed a questionnaire, which included questions about a history of tick-borne encephalitis, and a history of a vaccination against TBE. Two subjects did not return the questionnaires and were excluded from the analysis; they both tested negative for anti-TBEV IgG. The final group consisted of 298 patients: 71% men and 29% women, aged from 18 to 63 years (mean 34.1 years). The pediatric group consisted of 180 hospitalized children aged 2–17 years with signs of viral gastroenteritis, whose serum samples were used in research on the epidemiology and pathogenesis of infectious diseases in children in previous studies [21]. All participants included in the study group gave written informed consent to participate. A 1 mL sample of venous blood was drawn on clot, centrifuged and serum frozen to −80 °C and preserved until all the samples were thawed and studied simultaneously. The serologic examination was performed with FSME/TBE ELISA IgG/IgM from Virotech Diagnostics GmbH (Rüsselsheim, Germany), strictly following the manufacturer's instructions.

2.2. Questionnaire

We also performed an anonymous survey in a cohort of 444 adults recruited among parents whose children were hospitalized in the Department of Pediatric Infectious Diseases in Bialystok, Poland. All respondents lived in northeastern Poland, a high-risk area for tick-borne diseases (TBDs). The survey was carried out between December 2019 and September 2021. The survey consisted of four questions describing practices regarding ticks and tick bites, and seven evaluating demographics and exposure to tick bites.

2.3. Ethical Considerations

The study was approved by the Ethics Committee of the Medical University in Białystok (approval numbers R-I-002/241/2013, R-I-002/308/2019, R-I-002/489/2019, and APK.002.71.2020).

2.4. Statistical Analysis

Descriptive data are presented as frequencies and percentages. The attitude towards the TBE vaccine was evaluated using the binary logistic regression model. In univariate analysis we identified variables associated with a positive attitude towards the TBE vaccine (either a past vaccination or a declaration to receive the vaccine). In the multivariate analysis we included variables identified in the univariate analysis with the p-value equal to or below 0.2. A backward stepwise method was used and variables with a significant association were presented in the graphs only. The results of this analysis are shown as odds ratios (OR) and their respective 95% confidence intervals (95% CI). The statistical analysis was performed using TIBCO Software Inc. (2017) Statistica, version 13 (Palo Alto, CA, USA).

3. Results

3.1. Detection of Anti-TBEV IgG Antibodies

Four subjects, a woman, aged 25, and men, aged 33, 38 and 58, claimed that they had been diagnosed with TBE in the past. None of them tested positive for anti-TBEV IgG.

Thirty eight adult subjects (13%), including 31 men and seven women, aged 20 to 56, reported having received a vaccine against TBEV, including two who reported having received an incomplete scheme (one or two doses only) and one who reported not having received a booster dose for the last 15 years. The fraction of persons reporting vaccination was higher among men (15%) then women (7%). Twenty-six subjects with a history of TBE vaccination (68%) tested positive for specific anti-TBEV IgG. Two patients with incomplete vaccination were seronegative. Interestingly, the patient last vaccinated 15 years before the examination had a strong positive response.

Of 256 subjects reporting neither vaccination against nor being diagnosed with TBE, 14 (5%, seven men and seven women) tested positive. The remaining 242 adult subjects were seronegative. Groups of seropositive and seronegative vaccinated and non-vaccinated subjects did not differ significantly with age.

The pediatric study group consisted of 180 children aged 2–17 (median age 6 years). None of the children were vaccinated with the TBE vaccine, none were presenting symptoms corresponding with TBE, nor were diagnosed with TBE in the past. A total of four children (2%) tested positive.

3.2. Survey Evaluating Willingness to Vaccinate against TBE

We surveyed 444 adults (Table 1). The majority of respondents were women (82% 345/419) aged 30–39 (59%, 252/426), with higher education (66%, 281/426), living in urban areas (59%, 251/426). The surveyed cohort is a close proxy of the population in productive age from northeastern Poland. However, due to the sampling approach women under 50 years of age are overrepresented. Sixty-two percent (270/438) of the respondents have been bitten by a tick at least once in their life, while 17% (75/444) of respondents were bitten in the last year. Approximately 32% (139/433) reported that their child has also been bitten by a tick at least once in their life (Table 1). Only 9% (38/424) of the respondents reported a previous vaccination with the TBE vaccine, while 10% (40/413) have vaccinated their children. Among people who were not vaccinated, 31% (121/386) were willing to receive a TBE vaccine, while the majority (43%, 167/386) were unsure whether to vaccinate against TBE and 25% (98/386) presented an anti-vaccine approach. Amidst the parents who have not vaccinated their children, 37% (138/373) were planning to vaccinate their child, 20% (74/373) did not accept the vaccination, while 43% (161/373) were unsure.

Table 1. Characteristics of surveyed parents of children hospitalized in the Department of Pediatric Infectious Diseases in Bialystok.

Individual—Related Characteristic	Number (%)
Gender	**419 (100%)**
Male	74/419 (17.7%)
Female	345/419 (82.3%)
Age	**426 (100%)**
<29	76/426 (17.8%)
30–39	252/426 (59.2%)
40–49	85/426 (20%)
50–59	11/426 (2.6%)
>60	2/426 (0.4%)
Education	**426 (100%)**
Primary	11/426 (2.6%)
Secondary	134/426 (31.4%)
Higher	281/426 (66%)
Place of residence	**426 (100%)**
Village	175/426 (41.1%)
City more than 30,000 inhabitants	251/426 (58.9%)
Close relative diagnosed with TBD	104/433 (24%)
Tick-bite anytime in the past	270/438 (61.6%)
Tick-bite in the last year	75/444 (16.9%)
Tick-bite in the respondent's child	139/433 (32.1%)

Data presented as frequencies and percentages. Denominators lower than the study group indicate missing data. Abbreviations: TBD, tick-borne disease.

In univariate analysis, factors such as a history of a tick bite in the past, a history of a tick bite in a child of a person completing the questionnaire, an occurrence of a tick-borne disease in a close relative, and male gender were associated with a significantly higher likelihood of the respondent (Figure 1) or the respondent's child (Figure 2) receiving the TBE vaccine. According to the multivariate analysis, the odds of respondents receiving the vaccine were higher in those with a recent tick bite (OR, 2.65; 95% CI, 1.54–4.57; $p < 0.001$), a diagnosis of TBD in a close relative (OR, 1.71; 95% CI, 1.06–2.75; $p = 0.027$), and in males (OR, 1.77; 95% CI, 1.05–3.00; $p = 0.032$). The multivariate analysis also showed that a recent tick bite in a respondent was the only predictive variable for the vaccination of a respondent's child (OR, 2.53; 95% CI, 1.49–4.31; $p < 0.001$). We have also adopted a similar approach to investigate negative attitudes towards the TBE vaccine (respondents who were not vaccinated in the past and declare not to vaccinate in the future). We found that the younger subjects presented a more negative attitude. Respondents under the age of 40 were less likely to receive the TBE vaccine (OR, 0.40; 95% CI, 0.21–0.76; $p = 0.006$) and to vaccinate their child (OR, 0.30; 95% CI, 0.13–0.67; $p = 0.004$), compared to their older counterparts. Sex, education level, place of residence, and lack of exposure to ticks were not associated with the negative attitude.

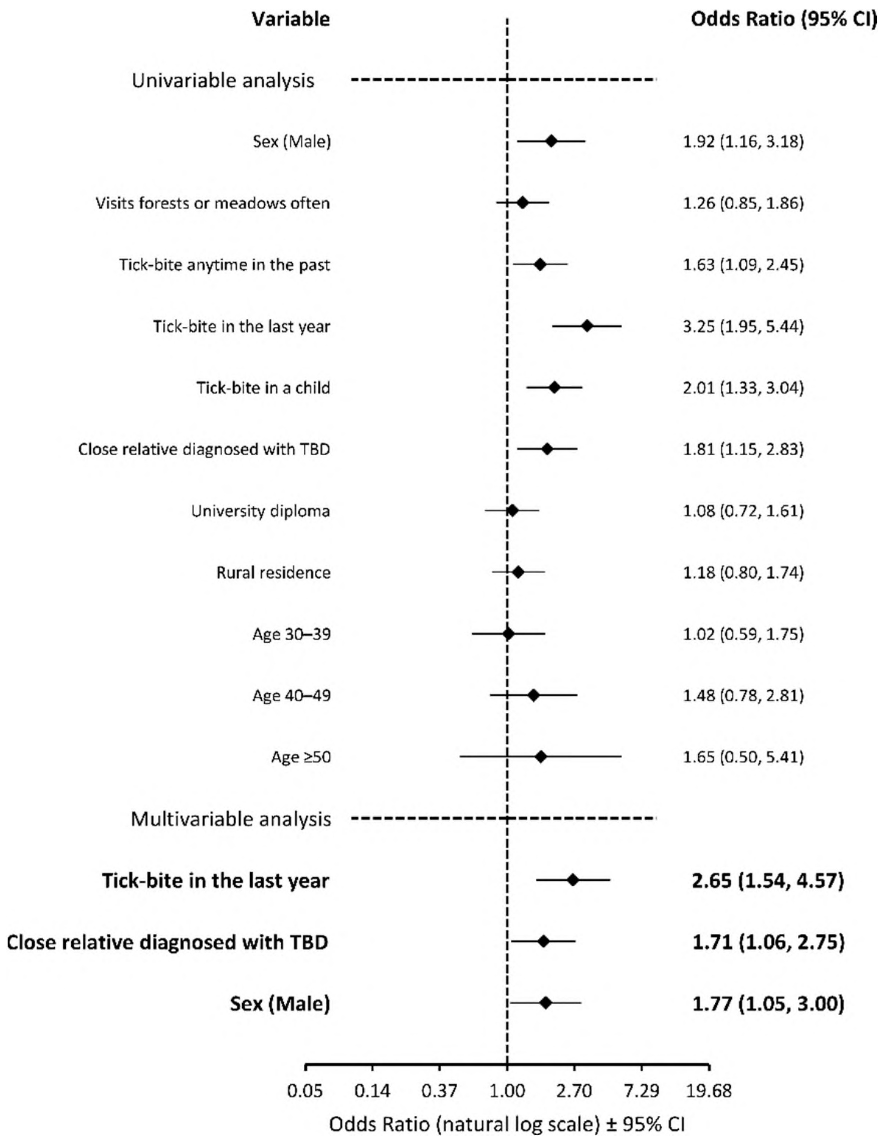

Figure 1. Binominal logistic regression analysis of variables associated with the odds of receiving or declaration to receive the TBE vaccine. The age-related odds were calculated with reference to age under 30 years. Abbreviations: TBD, tick-borne disease.

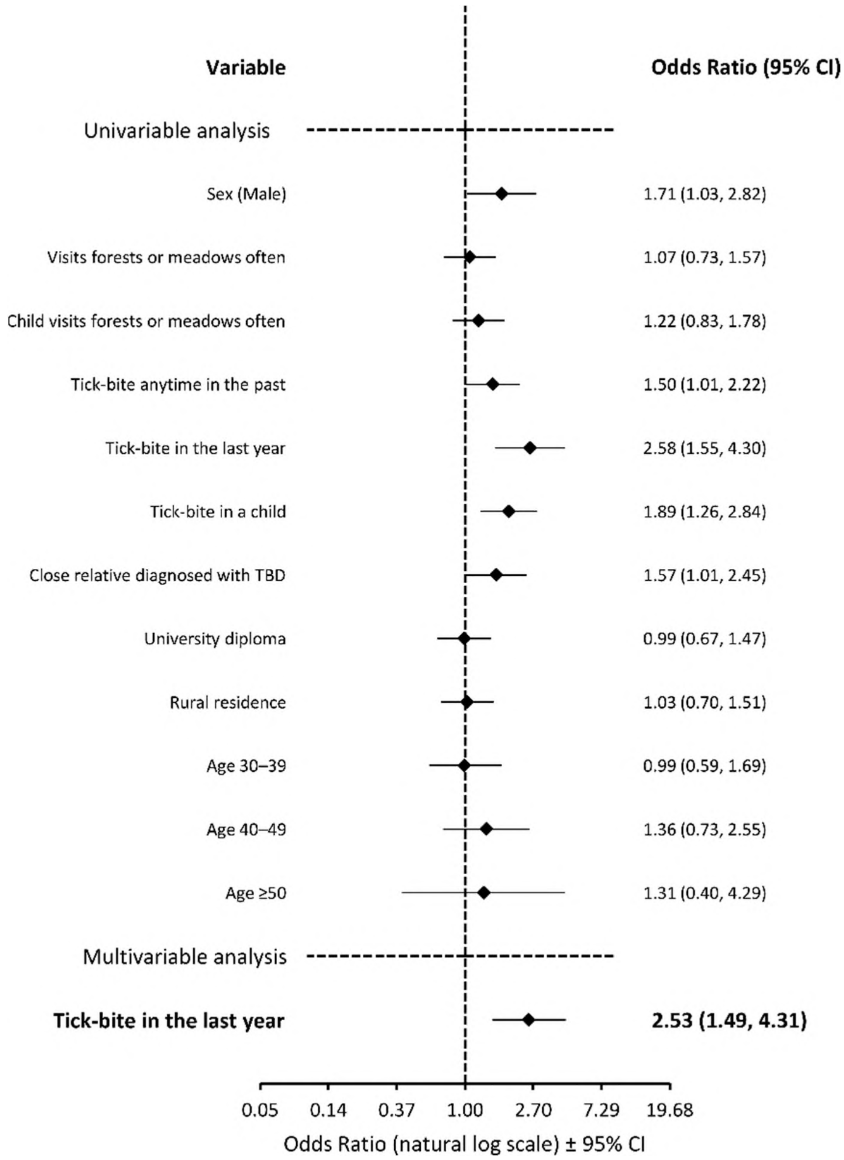

Figure 2. Binominal logistic regression analysis of variables associated with the odds of vaccinating or declaration to vaccinate the respondent's child with the TBE vaccine. The age-related odds were calculated with reference to age under 30 years. Abbreviations: TBD, tick-borne disease.

4. Discussion

In Western and Central Europe, tick-borne encephalitis is endemic and is one of the most important causes of human CNS infections. Currently there is no specific antiviral treatment available for TBE, therefore preventive measures are of prime importance. Vaccines are proven to be highly effective in preventing TBE and the vaccinations have been conducted for more than 30 years [22,23]. Based on the reports from the Polish National Institute of Public Health, the TBE vaccine was administered to around 1.1% of the total Polish population in years 2011–2020 [3]. In our study 13% of blood donors, 9% of the surveyed adults, and 10% of their children were vaccinated with the TBE vaccine. This might reflect an increased interest in the vaccine in the endemic area. According to different researchers, in other endemic European countries, vaccination rates vary between 0 and 40% depending on a region [24–27]. However, in Latvia, where TBE vaccination has been a part of a national vaccination program since 2007, the vaccination rate exceeds 50% [28,29]. On the other hand, the official vaccine reports might be underestimated because the TBE vaccine is not mandatory in Poland and therefore physicians are not required to report this immunization. Nevertheless, the uptake of the TBE vaccine in Poland is suboptimal. Given the potentially severe clinical course of the disease, the absence of antiviral treatment and the increasing population, ticks vaccination is the mainstay of prevention and control of TBE [18]. Therefore, it is imperative to increase the vaccination rate in populations living in endemic areas. We found that a recent tick bite and a diagnosis of TBD in a close relative were the two main drivers of the decision or intention to receive the TBE vaccine. This probably reflects the higher level of perceived susceptibility to TBDs, which is in line with previous studies, which showed that the more threatened people felt, the more they intended to get vaccinated [30–32]. In our research we discovered that the level of education and place of residence did not affect the attitude towards the TBE vaccine. Younger age was noted as a barrier, whereas being male was a promoter of vaccination (Figures 1 and 2). Sociodemographic factors presented a mixed picture of results in previous studies. According to research conducted in Switzerland and Austria, vaccination rates with the TBE vaccine tended to be higher in people under 60 years of age [33]. On the contrary, in Sweden the uptake of the TBE vaccine was higher in those aged over 60 years, compared to younger adults and children [34]. These conflicting research findings suggest that age is not necessarily a consistent motivation of TBE vaccination. The differences are most likely associated with occupation or preferred model of spending free time which varies depending on a country.

In our study, 12 among the 38 subjects reporting the history of vaccination tested negative for specific anti-TBEV IgG, which included two who had not completed the primary vaccination scheme. Interestingly, the patient who received a basic vaccination scheme but did not receive booster doses in the last 15 years obtained a strong humoral response in our study. In general, the seropositivity rate in vaccinated blood donors was rather low compared with literature data. Of note, although the subjects provided additional information regarding the vaccination date and completeness, we were not able to verify the full vaccination history. It was not our aim to verify the vaccination efficacy in a systematic manner, but, taking the above into consideration, our overall results seem consistent with the literature data. Due to the fact that vaccination against TBE has been proven to be highly effective, the rate of seropositivity according to various studies reaches 92–99% and it depends on time since vaccination and the immune status of patients [35]. Although vaccines produced in Europe have high immunogenicity, the persistence of their seroprotection remains in dispute. Studies have shown a gradual decrease in immunocompetence 10 years after the vaccination [36]. This decline is more clearly expressed in older individuals aged over 50 compared to younger people [37].

We should keep in mind that even though the TBE vaccination breakthrough cases are uncommon, they do occur. Several studies performed in Austria, Sweden and Slovenia have shown that between 0.7% to 3.1% of patients get this disease despite complete vaccination. However the majority of cases were observed among patients over 50 years old [38,39]. The severity of observed cases ranges from mild to severe with sometimes long-term neurological sequelae or even a fatal outcome [38,40]. It is also worth noticing that patients with autoimmune diseases, those who are HIV positive and children after thymectomy also present a lowered serological response to the TBE vaccine [41,42].

When it comes to the lack of a specific immune response in all four patients who had TBE diagnosed in the past, it is problematic and difficult to explain only with progressive weakening of the immune response. If these seronegative patients truly had symptomatic TBE in the past, it would mean that the rate of the past asymptomatic infections assessed by IgG serology could have been seriously underestimated. However, as our results are based on a questionnaire filled during the donation procedure, we were unable to verify the diagnosis of TBE in these subjects. The possible confounding diagnoses include viral meningitis of non-TBE etiology, which could be attributed to TBEV in a highly endemic area, and early neuroborreliosis, which is common in the area and could not be differentiated from TBE by the reporting patients.

Five percent of adults and 2% of children who had never been diagnosed with TBE or vaccinated against it tested positive for the specific anti-TBEV IgG. There were no previous TBEV seroprevalence studies conducted among unvaccinated individuals living in a TBE endemic area in Poland. According to the latest data from Norway, the phenomenon of TBEV IgG seroprevalence in the general population ranges from 0.4% up to 1.4% [43,44]. However, among high-risk populations living in endemic areas the seroprevalence rates are substantially higher, ranging from 4% up to 22% depending on the investigated area, which is consistent with our results [45]. No data are available on the seroprevalence of TBEV IgG antibodies in children. Our results show that seroprevalence in children was lower than in adults. This is consistent with lower rates of symptomatic disease in children across Europe [46]. In our previous study conducted on the same area, the annual incidence of neuroinfectious caused by TBEV in children was estimated to be lower compared to the general population [47]. Surprisingly, in Serbia the seroprevalence of TBEV IgG was higher in children than in adults and reached 18%, probably reflecting differences in exposures to tick-bites between populations [48]. TBEV seems to be the only circulating Flavivirus in Poland as our region is not endemic for dengue, yellow fever or Zika. The study performed by Piotr Czupryna et al. in 2014 found no evidence of West Nile RNA in CSF collected from patients with lymphocytic meningitis in Podlaskie voivodship [8]. What is more, the study conducted by the Department of Poultry Diseases, National Veterinary Research Institute on 1912 Polish birds, as well as the study of Kubica-Biernat et al., which examined WNV RNA in mosquitoes from four Polish regions (including Podlaskie voivodeship), showed no presence of this pathogen. The results are consistent with other studies performed in Poland [7,9,10]. Therefore, it is highly unlikely that other tick-borne and mosquito-borne flaviviruses would induce antibodies detectable by ELISA in this study.

The TBEV disease that is limited to a peripheral flu-like phase without CNS involvement was described as abortive TBE and hypothesized to be a cause of undiagnosed seroconversions. However, in a group of 56 patients diagnosed and prospectively observed since the peripheral phase, 55 (98.2%) progressed to the neurologic phase and only one recovered after the initial febrile episode, which means that abortive TBE is rare compared to a typical biphasic disease with CNS involvement and cannot account for a large number of undiagnosed cases [17]. Thus, the seropositivity in persons with no history of TBE seems to be caused mostly by asymptomatic or very mild afebrile infections and only sporadically by an abortive form of TBE virus infection [17]. These cases cannot be diagnosed on clinical grounds and their frequency remains unknown [11]. However, they could significantly exceed the number of symptomatic cases. In a prospective study of a high risk population in Sweden, Gustafson et al. observed two cases of TBE versus eight cases of asymptomatic seroconversion, suggesting that as much as 80% of TBEV infections may not manifest clinically [15].

The reasons for an apparently high rate of asymptomatic infections with TBEV remain unclear. The virus-related factors, for example the low infectious dose or low pathogenicity of the infecting strain could contribute to the favorable outcome of the infection. However, all the subjects came from a relatively small geographic area, in which only European TBEV subtype with a high level of nucleotide sequence similarity between different isolates circulates [6], which makes any significant impact of the TBE variability unlikely. The animal models suggest that the course of the TBEV infection is determined in several stages, from the local replication and spread from the infection site, through peripheral infection and viremia, penetration across the blood–brain barrier (neuroinvasion) to the CNS involvement. Moreover, host-related factors play an important role in determining the outcome at each of these stages [49]. The ineffective or misdirected immune response may be unable to control the infection or even facilitate it, for example by virus spread within infected leukocytes or blood–brain barrier disruption by inflammatory mediators, determining a highly variable presentation, from asymptomatic to clinically severe. This in turn might depend on genetic factors, some of which have been suggested in the population-based genetic association studies comparing TBE patients to healthy individuals from the endemic area [13,50–52], but most probably remains undefined. We suggest that that the healthy seropositive individuals from the endemic areas, similar to those identified in our study, could constitute a highly relevant control group in future genetic association studies. Such subjects are likely to have been infected by TBEV in the past without having succumbed to a symptomatic neuroinfection, so their direct comparison with patients with symptomatic TBE would be optimal to reveal the potential genetic predisposing and protective factors.

This study has several limitations. The reported vaccination rate might be overestimated due to the nature of an anonymous survey. Second, the immunological response after the TBE infection fades over time, which might underestimate the calculated seroprevalence. Additionally, due to inability to verify the survey data and lack of access to personal health information or other identifiable data, the true rate of asymptomatic and mild TBEV infections among the seropositive individuals should be interpreted with caution.

5. Conclusions

Our findings confirm that exposure to ticks in northeastern Poland is associated with a high risk of TBEV infection. In addition, the rate of mild and asymptomatic infections seems to be high and the identification of infected people would be a valuable source of information that would enable a more detailed understanding of the etiopathogenesis of the disease, as well as predisposing and protective factors, both genetic and environmental. Considering the estimated high incidence of the disease in the unvaccinated population and low vaccination rates, there is an urgent need to raise awareness and knowledge about the benefits and importance of TBE vaccination. Implementing a vaccination register would be valuable for following the epidemiological situation of TBE in relation to vaccination coverage.

Author Contributions: E.B. wrote the manuscript and prepared the survey, K.T. participate in preparing the manuscript and analyzed the data, S.G. conceived the study, performed the statistical analysis and wrote the manuscript, J.D. and B.Z.-R. performed and interpreted the serology, A.Z. recruited the subjects and supervised the sample collection and handling, P.C. participate in the study design and in preparing the manuscript, A.M.-M. and A.S. participated in the study design and supervision. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Medical University of Bialystok, Poland. Grant no. SUB/1/DN/22/001/1148 and co-funded from the National Science Centre, Poland (project no 2018/31/B/NZ6/02744).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Bioethics Committee of Medical University of Bialystok (approval numbers R-I-002/241/2013, R-I-002/308/2019, R-I-002/489/2019, and APK.002.71.2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Yoshii, K. Epidemiology and Pathological Mechanisms of Tick-Borne Encephalitis. *J. Vet. Med. Sci.* **2019**, *81*, 343–347. [CrossRef] [PubMed]
2. Radzišauskienė, D.; Žagminas, K.; Ašoklienė, L.; Jasionis, A.; Mameniškienė, R.; Ambrozaitis, A.; Jančorienė, L.; Jatužis, D.; Petraitytė, I.; Mockienė, E. Epidemiological Patterns of Tick-Borne Encephalitis in Lithuania and Clinical Features in Adults in the Light of the High Incidence in Recent Years: A Retrospective Study. *Eur. J. Neurol.* **2018**, *25*, 268–274. [CrossRef]
3. Bulletins, Reports, Epidemiological Information—National Institute of Public Health. Available online: http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index_p.html (accessed on 23 September 2021).
4. Beauté, J.; Spiteri, G.; Warns-Petit, E.; Zeller, H. Tick-Borne Encephalitis in Europe, 2012 to 2016. *Eurosurveillance* **2018**, *23*, 1800201. [CrossRef]

5. Taba, P.; Schmutzhard, E.; Forsberg, P.; Lutsar, I.; Ljøstad, U.; Mygland, Å.; Levchenko, I.; Strle, F.; Steiner, I. EAN Consensus Review on Prevention, Diagnosis and Management of Tick-Borne Encephalitis. *Eur. J. Neurol.* **2017**, *24*, 1214-e61. [CrossRef]
6. Katargina, O.; Russakova, S.; Geller, J.; Kondrusik, M.; Zajkowska, J.; Zygutiene, M.; Bormane, A.; Trofimova, J.; Golovljova, I. Detection and Characterization of Tick-Borne Encephalitis Virus in Baltic Countries and Eastern Poland. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61374. [CrossRef] [PubMed]
7. Moniuszko-Malinowska, A.; Dunaj, J.; Czupryna, P.; Król, M.; Grygorczuk, S.; Świerzbińska, R.; Pancewicz, S. Absence of Serological Evidence for WNV Presence in Symptomatic Patients in Poland. *Infect. Dis.* **2019**, *51*, 782–784. [CrossRef]
8. Czupryna, P.; Niczyporuk, J.; Samorek-Salamonowicz, E.; Moniuszko, A.; Dunaj, J.; Zajkowska, J.; Pancewicz, S.A. Detection of West Nile Virus RNA in Patients with Meningitis in Podlaskie Province. *Prz. Epidemiol.* **2014**, *68*, 17–20, 109–111.
9. Jabłońska, J.; Popiel, M.; Bukowska-Ośko, I.; Perlejewski, K.; Cortés, K.C.; Horban, A.; Demkow, U.; Laskus, T.; Radkowski, M. No Evidence of West Nile Virus Infection among Polish Patients with Encephalitis. *Cent. Eur. J. Immunol.* **2016**, *41*, 383–385. [CrossRef]
10. Popiel, M.; Perlejewski, K.; Bednarska, A.; Dzieciątkowski, T.; Paciorek, M.; Lipowski, D.; Jabłonowska, M.; Czeszko-Paprocka, H.; Bukowska-Ośko, I.; Caraballo Cortes, K.; et al. Viral Etiologies in Adult Patients with Encephalitis in Poland: A Prospective Single Center Study. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0178481. [CrossRef]
11. Bogovic, P.; Strle, F. Tick-Borne Encephalitis: A Review of Epidemiology, Clinical Characteristics, and Management. *World J. Clin. Cases* **2015**, *3*, 430–441. [CrossRef]
12. Bardina, S.V.; Lim, J.K. The Role of Chemokines in the Pathogenesis of Neurotropic Flaviviruses. *Immunol. Res.* **2012**, *54*, 121–132. [CrossRef] [PubMed]
13. Mickienė, A.; Laiškonis, A.; Günther, G.; Vene, S.; Lundkvist, Å.; 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]
14. Czupryna, P.; Moniuszko, A.; Pancewicz, S.A.; Grygorczuk, S.; Kondrusik, M.; Zajkowska, J. Tick-Borne Encephalitis in Poland in Years 1993–2008—Epidemiology and Clinical Presentation. A Retrospective Study of 687 Patients: Tick-Borne Encephalitis in Poland. *Eur. J. Neurol.* **2011**, *18*, 673–679. [CrossRef]
15. 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. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1992**, *11*, 894–900. [CrossRef]
16. Booy, R.; Richmond, P.; Nolan, T.; McVernon, J.; Marshall, H.; Nissen, M.; Reynolds, G.; Ziegler, J.B.; Heron, L.; Lambert, S.; et al. Immediate and longer term immunogenicity of a single dose of the combined Haemophilus influenzae type b-Neisseria meningitidis serogroup c-Tetanus toxoid conjugate vaccine in primed toddlers 12 to 18 months of age. *Pediatric Infect. Dis. J.* **2011**, *30*, 340–342. [CrossRef] [PubMed]
17. Lotric-Furlan, S.; Avsic-Zupanc, T.; Strle, F. An Abortive Form of Tick-Borne Encephalitis (TBE)–a Rare Clinical Manifestation of Infection with TBE Virus. *Wien. Klin. Wochenschr.* **2002**, *114*, 627–629. [PubMed]
18. Panatto, D.; Domnich, A.; Amicizia, D.; Reggio, P.; Iantomasi, R. Vaccination against Tick-Borne Encephalitis (TBE) in Italy: Still a Long Way to Go. *Microorganisms* **2022**, *10*, 464. [CrossRef] [PubMed]
19. Cocchio, S.; Bertoncello, C.; Napoletano, G.; Claus, M.; Furlan, P.; Fonzo, M.; Gagliani, A.; Saia, M.; Russo, F.; Baldovin, T.; et al. Do We Know the True Burden of Tick-Borne Encephalitis? A Cross-Sectional Study. *Neuroepidemiology* **2020**, *54*, 227–234. [CrossRef]
20. Šmit, R. Reviewing Estimates of the Burden in Disability-Adjusted Life Years (DALYs) of Tick-Borne Encephalitis in Slovenia. *Expert Rev. Pharm. Outcomes Res.* **2019**, *19*, 299–303. [CrossRef]
21. Kroten, A.; Toczylowski, K.; Kiziewicz, B.; Oldak, E.; Sulik, A. Environmental Contamination with Toxocara Eggs and Seroprevalence of Toxocariasis in Children of Northeastern Poland. *Parasitol. Res.* **2016**, *115*, 205–209. [CrossRef]
22. Kunz, C. TBE Vaccination and the Austrian Experience. *Vaccine* **2003**, *21*, S50–S55. [CrossRef]
23. Heinz, F.X.; Holzmann, H.; Essl, A.; Kundi, M. Field Effectiveness of Vaccination against Tick-Borne Encephalitis. *Vaccine* **2007**, *25*, 7559–7567. [CrossRef] [PubMed]
24. Riccò, M.; Bragazzi, N.L.; Vezzosi, L.; Balzarini, F.; Colucci, M.E.; Veronesi, L. Knowledge, Attitudes, and Practices on Tick-Borne Human Diseases and Tick-Borne Encephalitis Vaccine among Farmers from North-Eastern Italy (2017). *J. Agromedicine* **2019**, *25*, 73–85. [CrossRef] [PubMed]
25. Zöldi, V.; Turunen, T.; Lyytikäinen, O.; Sane, J. Knowledge, Attitudes, and Practices Regarding Ticks and Tick-Borne Diseases, Finland. *Ticks Tick-borne Dis.* **2017**, *8*, 872–877. [CrossRef] [PubMed]
26. Kunze, U. The International Scientific Working Group on Tick-Borne Encephalitis (ISW TBE): Review of 17 Years of Activity and Commitment. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2016**, *7*, 399–404. [CrossRef]
27. Zavadska, D.; Odzelevica, Z.; Karelis, G.; Liepina, L.; Litauniece, Z.A.; Bormane, A.; Lucenko, I.; Perevoscikovs, J.; Bridina, L.; Veide, L.; et al. Tick-Borne Encephalitis: A 43-Year Summary of Epidemiological and Clinical Data from Latvia (1973 to 2016). *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204844. [CrossRef]
28. Zavadska, D.; Anca, I.; Andre, F.; Bakir, M.; Chlibek, R.; Čižman, M.; Ivaskeviciene, I.; Mangarov, A.; Mészner, Z.; Pokorn, M.; et al. Recommendations for Tick-Borne Encephalitis Vaccination from the Central European Vaccination Awareness Group (CEVAG). *Hum. Vaccines Immunother.* **2013**, *9*, 362–374. [CrossRef]
29. Ruzek, D.; Avšič Županc, 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. *Antivir. Res.* **2019**, *164*, 23–51. [CrossRef]

30. Renner, B.; Reuter, T. Predicting Vaccination Using Numerical and Affective Risk Perceptions: The Case of A/H1N1 Influenza. *Vaccine* **2012**, *30*, 7019–7026. [CrossRef]
31. Schmid, P.; Rauber, D.; Betsch, C.; Lidolt, G.; Denker, M.-L. Barriers of Influenza Vaccination Intention and Behavior—A Systematic Review of Influenza Vaccine Hesitancy, 2005–2016. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170550. [CrossRef]
32. Hilverda, F.; Vollmann, M. The Role of Risk Perception in Students' COVID-19 Vaccine Uptake: A Longitudinal Study. *Vaccines* **2022**, *10*, 22. [CrossRef] [PubMed]
33. Baroutsou, V.; Zens, K.D.; Sinniger, P.; Fehr, J.; Lang, P. Analysis of Tick-Borne Encephalitis Vaccination Coverage and Compliance in Adults in Switzerland, 2018. *Vaccine* **2020**, *38*, 7825–7833. [CrossRef] [PubMed]
34. Askling, H.H.; Insulander, M.; Hergens, M.-P.; Leval, A. Tick Borne Encephalitis (TBE)-Vaccination Coverage and Analysis of Variables Associated with Vaccination, Sweden. *Vaccine* **2015**, *33*, 4962–4968. [CrossRef] [PubMed]
35. Demicheli, V.; Debalini, M.G.; Rivetti, A. Vaccines for Preventing Tick-Borne Encephalitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2009**, *2009*, CD000977. [CrossRef] [PubMed]
36. Paulke-Korinek, M.; Kundi, M.; Laaber, B.; Brodtraeger, N.; Seidl-Friedrich, C.; Wiedermann, U.; Kollaritsch, H. Factors Associated with Seroimmunity against Tick Borne Encephalitis Virus 10 Years after Booster Vaccination. *Vaccine* **2013**, *31*, 1293–1297. [CrossRef]
37. Lindblom, P.; Wilhelmsson, P.; Fryland, L.; Matussek, A.; Haglund, M.; Sjöwall, J.; Vene, S.; Nyman, D.; Forsberg, P.; Lindgren, P.-E. Factors Determining Immunological Response to Vaccination against Tick-Borne Encephalitis Virus in Older Individuals. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e100860. [CrossRef]
38. Andersson, C.R.; Vene, S.; Insulander, M.; Lindquist, L.; Lundkvist, Å.; Günther, G. Vaccine Failures after Active Immunisation against Tick-Borne Encephalitis. *Vaccine* **2010**, *28*, 2827–2831. [CrossRef]
39. Stiasny, K.; Holzmann, H.; Heinz, F.X. Characteristics of Antibody Responses in Tick-Borne Encephalitis Vaccination Breakthroughs. *Vaccine* **2009**, *27*, 7021–7026. [CrossRef]
40. Sendi, P.; Hirzel, C.; Pfister, S.; Ackermann-Gäumann, R.; Grandgirard, D.; Hewer, E.; Nirkko, A.C. Fatal Outcome of European Tick-Borne Encephalitis after Vaccine Failure. *Front. Neurol.* **2017**, *8*, 119. [CrossRef]
41. Prelog, M.; Wilk, C.; Keller, M.; Karall, T.; Orth, D.; Geiger, R.; Walder, G.; Laufer, G.; Cottogni, M.; Zimmerhackl Lothar, B.; et al. Diminished Response to Tick-Borne Encephalitis Vaccination in Thymectomized Children. *Vaccine* **2008**, *26*, 595–600. [CrossRef]
42. Panasiuk, B.; Prokopowicz, D.; Panasiuk, A. Immunological Response in HIV-Positive Patients Vaccinated against Tick-Borne Encephalitis. *Infection* **2003**, *31*, 45–46. [CrossRef] [PubMed]
43. Marvik, Å.; Tveten, Y.; Pedersen, A.-B.; Stiasny, K.; Andreassen, Å.K.; Grude, N. Low Prevalence of Tick-Borne Encephalitis Virus Antibodies in Norwegian Blood Donors. *Infect. Dis.* **2021**, *53*, 44–51. [CrossRef]
44. Thortveit, E.T.; Aase, A.; Petersen, L.B.; Lorentzen, Å.R.; Mygland, Å.; Ljøstad, U. Human Seroprevalence of Antibodies to Tick-Borne Microbes in Southern Norway. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2020**, *11*, 101410. [CrossRef] [PubMed]
45. Gustafson, R.; Forsgren, M.; Gardulf, A.; Granström, M.; Svenungsson, B. Clinical Manifestations and Antibody Prevalence of Lyme Borreliosis and Tick-Borne Encephalitis in Sweden: A Study in Five Endemic Areas Close to Stockholm. *Scand. J. Infect. Dis.* **1993**, *25*, 595–603. [CrossRef]
46. Steffen, R. Tick-Borne Encephalitis (TBE) in Children in Europe: Epidemiology, Clinical Outcome and Comparison of Vaccination Recommendations. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2019**, *10*, 100–110. [CrossRef]
47. Toczylowski, K.; Bojkiewicz, E.; Barszcz, M.; Wozinska-Klepadlo, M.; Potocka, P.; Sulik, A. Etiology, Clinical Presentation and Incidence of Infectious Meningitis and Encephalitis in Polish Children. *JCM* **2020**, *9*, 2324. [CrossRef]
48. Banović, P.; Obregón, D.; Mijatović, D.; Simin, V.; Stankov, S.; Budakov-Obradović, Z.; Bujandrić, N.; Grujić, J.; Sević, S.; Turkulov, V.; et al. Tick-Borne Encephalitis Virus Seropositivity among Tick Infested Individuals in Serbia. *Pathogens* **2021**, *10*, 301. [CrossRef]
49. Hayasaka, D.; Nagata, N.; Fujii, Y.; Hasegawa, H.; Sata, T.; Suzuki, R.; Gould, E.A.; Takashima, I.; Koike, S. Mortality Following Peripheral Infection with Tick-Borne Encephalitis Virus Results from a Combination of Central Nervous System Pathology, Systemic Inflammatory and Stress Responses. *Virology* **2009**, *390*, 139–150. [CrossRef]
50. Grygorczuk, S.; Parczewski, M.; Świerzbińska, R.; Czupryna, P.; Moniuszko, A.; Dunaj, J.; Kondrusik, M.; Pancewicz, S. The Increased Concentration of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Serum and Cerebrospinal Fluid of Patients with Tick-Borne Encephalitis. *J. Neuroinflammation* **2017**, *14*, 126. [CrossRef]
51. Barkhash, A.V.; Perelygin, A.A.; Babenko, V.N.; Myasnikova, N.G.; Pilipenko, P.I.; Romaschenko, A.G.; Voevoda, M.I.; Brinton, M.A. Variability in the 2′-5′-Oligoadenylate Synthetase Gene Cluster Is Associated with Human Predisposition to Tick-Borne Encephalitis Virus–Induced Disease. *J. Infect. Dis.* **2010**, *202*, 1813–1818. [CrossRef]
52. Barkhash, A.V.; Perelygin, A.A.; Babenko, V.N.; Brinton, M.A.; Voevoda, M.I. Single Nucleotide Polymorphism in the Promoter Region of the CD209 Gene Is Associated with Human Predisposition to Severe Forms of Tick-Borne Encephalitis. *Antivir. Res.* **2012**, *93*, 64–68. [CrossRef] [PubMed]

9.3. The Role of Chitinase 3-Like-1 (YKL-40) and Proinflammatory Biomarkers in the Pathogenesis of Pediatric Tick-Borne Encephalitis in a Polish Cohort. Bojkiewicz E, Toczyłowski K, Lewandowski D, Martonik D, Flisiak R, Sulik A. (2024). Journal of Inflammation Research 5:17:10239-10254 doi: 10.2147/JIR.S480556

Journal of Inflammation Research Dovepress

Open Access Full Text Article

ORIGINAL RESEARCH

The Role of Chitinase 3-Like-1 (YKL-40) and Proinflammatory Biomarkers in the Pathogenesis of Pediatric Tick-Borne Encephalitis in a Polish Cohort

Ewa Bojkiewicz[1], Kacper Toczylowski[1], Dawid Lewandowski[1], Diana Martonik[2], Robert Flisiak[2], Artur Sulik[1]

[1]Department of Pediatric Infectious Diseases, Medical University of Bialystok, Bialystok, Poland; [2]Department of Infectious Diseases and Hepatology, Medical University of Bialystok, Bialystok, Poland

Correspondence: Kacper Toczylowski, Email kacper.toczylowski@umb.edu.pl

Background: Chitinase 3-like-1 (CHI3L1), also known as YKL-40, is a potential biomarker for neuroinflammatory conditions. It is upregulated in Alzheimer's disease, multiple sclerosis, and traumatic brain injury. However, its involvement in pediatric tick-borne encephalitis (TBE) has not been addressed yet. This study aimed to evaluate CHI3L1 and its relationship with other inflammatory cytokines, blood-brain barrier (BBB) integrity, immune response, and disease severity in pediatric patients with TBE.

Patients and Methods: A total of 22 pediatric TBE patients hospitalized in Bialystok, Poland were included in this study. Participants were categorized as having meningoencephalitis (n=6) or meningitis (n=16). The integrity of the brain-blood barrier (BBB) was assessed using the albumin quotient (albQ). Biomarker indices were calculated to account for variations in BBB permeability. The concentrations of CHI3L1, CCL2, chemerin, CXCL2, IFN-γ, IL-1-β, IL-4, IL-6, IL-13, and TNF-α in both serum and CSF, were measured using the Luminex Multiplex Assay od admission and two weeks later when symptoms resolved.

Results: CSF and serum concentrations of CHI3L1 did not differ between the encephalitis and meningitis cases. After adjusting for BBB permeability, the CHI3L1 index was 2.4-fold lower in patients with encephalitis than in those with meningitis (P=0.008). There was a post-treatment reduction of CHI3L1, IL-6, and TNF-α CSF concentrations. We also found and improvement in BBB permeability in younger children but in older albQ remained abnormal. Correlation analysis revealed associations between CHI3L1 levels and pro-inflammatory markers, notably chemerin, IL-6, and TNF-α, across both clinical groups.

Conclusion: Our findings suggest that CHI3L1 CSF levels reflect the inflammatory activity in pediatric TBE and may help to differentiate between meningoencephalitis and meningitis. The observed interactions between CHI3L1 and other cytokines underscore its potential involvement in inflammatory response to the virus. The prolonged disruption in BBB integrity in older children might reflect age-dependent differences in the severity of TBE. These insights advance our understanding of TBE pathogenesis in children and support further investigation of CHI3L1 as a biomarker for TBE diagnosis and management.

Keywords: chitinase-3-like-1, tick-borne encephalitis, blood-brain barrier, ticks, chemokines

Introduction

Tick-borne encephalitis (TBE) is one of the most prevalent viral infections of the central nervous system (CNS) in Poland and is caused by the tick-borne encephalitis virus (TBEV).[1] This virus predominantly spreads through infected ticks of the genus *Ixodes* and can culminate in severe sequelae. The mortality rate for TBE vary depending on the virus subtype. Case-fatality rate is estimated to be less than 2% for European and Siberian subtype, while infections with Far Eastern TBEV subtype have a mortality rate of 20%-40%.[2] Reports indicate that 20–58% of patients suffer from complications such as spinal nerve paresis, hearing impairment, dysarthria, or mental disorders.[2,3] The recovery time for TBE can varies depending on the severity of the infection. In general, it may take several weeks to 12 months for a complete recovery,

Received: 30 May 2024
Accepted: 17 November 2024
Published: 5 December 2024

especially in cases with neurological involvement. While it has been proven that the severity of complications continue to diminish beyond a year after the acute illness, some individuals experience post - encephalitic syndrome (PES) that can become permanent, with some individuals not achieving full recovery even 15 years after infection.[4] TBEV infections have been on the rise across Europe, with Poland experiencing an annual caseload ranging from 150 to 283, predominantly concentrated in the northeastern region.[5]

Diagnosing TBE relies on clinical symptoms and the detection of specific antibodies in both serum and cerebrospinal fluid (CSF), which are present in general in 93% of patients.[6] While CSF characteristics can vary depending on the disease stage and the patient there are some characteristic findings. Reports show that approximately 70–90% of patients may have elevated albumin concentrations. Higher albumin CSF/serum quotient, along with elevated IgG index, are observed in a similar proportion of cases, roughly in the range of 60–80% and 80–90% of cases respectively.[7] Additionally, as with other neurotropic *Flaviviruses* such as West Nile virus (WNV) and Japanese encephalitis virus (JEV), initial diagnostic examinations may reveal a predominance of neutrophils in the CSF leukocyte population.[8–10]

Disruption of the blood-brain barrier (BBB) and the ensuing intrathecal humoral response are pivotal facets of TBE pathogenesis. Although the precise mechanisms by which the TBE virus compromises the BBB remain elusive, it is postulated that the virus may directly infect and impair endothelial cells, thereby increasing BBB permeability and facilitating the ingress of viruses and immune cells into the brain.[9,10] Additionally, inflammatory molecules, including cytokines and chemokines such as IFNγ, TNFα, IL-6, IL-12, IL-1β, CCL-2, CCL-3, CXCL-10, may fuel immune responses in the brain, exacerbating tissue damage and the manifestation of neurological symptoms.[11,12]

Chitinase 3-like-1 (CHI3L1), also known as YKL-40, has emerged as a potential marker of various neuroinflammatory processes and plays a pivotal role in mediating inflammation and immune responses. Elevated CHI3L1 expression has been noted in conditions such as Alzheimer's disease, multiple sclerosis, and traumatic brain injury, suggesting its involvement in the pathogenesis and progression of these disorders.[13,14] Dorcet et al have described how CHI3L1 could be a valuable biomarker to follow autoimmune encephalitis activity and in consequence supports the clinician's therapeutic decision in questionable cases.[15] However, the exact mechanisms and therapeutic implications of CHI3L1 in other brain pathologies remain unclear.

CHI3L1, a glycoprotein belonging to the family of 18 glycosyl hydrolases, is primarily secreted by activated neutrophils and macrophages. Within the central nervous system, microglia, especially in response to acute and chronic inflammation, serve as the primary source of CHI3L1 secretion.[16] It has been proposed that other intrathecal chemokines mediate and balance immune responses in brain cells. Previous research suggests that CHI3L1 production is influenced by various cytokines and chemokines, including IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-6, IL-13, CCL2, CXCL2, and chemerin.[17–20] However, unresolved questions remain regarding the dynamics of protein production during the course of TBE and their potential beneficial or deleterious effects. Hence, this study aimed to analyze the role of CHI3L1 in the pathogenesis of TBE. We also sought to investigate if CHI3L1 was connected to the severity of TBE, the disruption of the BBB and to investigate relationships between CHI3L1 and selected pro- and anti-inflammatory factors.

Material and Methods

Twenty-two children diagnosed with tick-borne encephalitis (TBE) and hospitalized between June 2020 and August 2022 in the Department of Pediatric Infectious Diseases in Bialystok, Poland were included in this study. None of the patients had a history of TBE vaccination and all resided in Podlaskie Voivodeship, where the European subtype of TBEV is endemic. The biphasic course of the infection was recorded in 19 children, the remaining three reported monophasic infection. The median duration of neurological symptoms before lumbar puncture was three days (IQR, 3–4 days).

The patients were divided into two groups: meningoencephalitis (n=6) and meningitis (n=16). Meningoencephalitis was diagnosed when inflammatory parameters in the CSF, altered consciousness, and focal neurological symptoms were present, whereas meningitis was diagnosed on the basis of inflammatory parameters in the CSF without focal neurological symptoms. TBE was diagnosed based on the presence of specific anti-TBEV IgG and IgM antibodies in serum and/ or CSF detected with commercially available enzyme-linked immunosorbent assays, meeting the diagnostic criteria of the European Academy of Neurology.[7]

TBE severity was assessed on admission to the hospital using a numeric scale and standardized questionnaire according to a paper published in 2014 by Petra Bogovic.[21] This scale was originally used for adult populations. However, due to the lack of studies on pediatric populations, we decided to implement this scale in our analysis. A certain number of points (from 1 to 9) were assigned for the presence, intensity, and duration of each individual symptom, such as the presence and duration of headache, fever, vomiting, and meningeal signs; presence of tremor, pareses, urine retention, and cognitive function disturbances; presence and intensity of conscious disturbances; and need for and duration of treatment of elevated intracranial pressure. Clinically, mild, moderate, and severe disease courses correspond to scores of 0–8, 9–22, and >22, respectively.

Luminex assays (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) were used for the quantitative assessment of CHI3L1, Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL-2), chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2), chemerin, interferon gamma (IFN-γ), interleukin 1 beta (IL-1β), IL-4, IL-6, IL-13, and tumor necrosis factor alpha (TNF-α) levels in both serum and CSF samples. Serum and CSF samples were taken on the same day from each included patient twice: on admission (T1) and 14 days after symptom resolution (T2). All collected samples were immediately stored at −80°C before analysis.

Assays were conducted according to the manufacturer's instructions using the Bio-Plex 200 System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). This multiplex immunoassay system facilitates simultaneous detection of multiple analytes within a single serum sample. Prior to analysis, serum samples were subjected to processing and storage following standardized protocols to maintain sample integrity. Quality control measures were implemented to ensure precision and reproducibility of the assay outcomes. These measures included the utilization of standard reference materials and the generation of calibration curves. All assay methodologies and procedures strictly adhered to both the manufacturer's guidelines and established laboratory protocols.

Concentrations of measured cytokines and chemokines was further corrected to the permeability of the BBB. BBB permeability was assessed using the albumin quotient (Q) and the concentrations of the analyzed proteins in the CSF were adjusted accordingly. Calculated albumin Q levels where compared to the normal values.[22] The CSF/serum quotient was calculated by dividing the concentration of each cytokine or chemokine in the CSF by that in the serum (biomarker in CSF/biomarker in serum). The CSF/serum index was defined as the ratio of the quotients of each studied chemokine or cytokine to that of albumin (Q-biomarker/Q-albumin).

Statistical Analysis

All analyses were conducted using the R Statistical language (version 4.1.1; R Core Team, 2021) on Windows 10 pro 64 bit (build 19045), using the package *effectsize* (version 0.8.3[23]), *rio* (version 0.5.29[24]), *report* (version 0.5.7[25]), *ggstatsplot* (version 0.9.3[26]), *gtsummary* (version 1.6.2[27]), *cutpointr* (version 1.1.2[28]), *readxl* (version 1.3.1[29]), and *dplyr* (version 1.1.2[30]). The significance level of the statistical tests in this analysis was set at α=0.05. The normality of the distributions of the variables was analyzed using the Shapiro–Wilk test. Numerical variables with distributions deviating from the normal distribution were reported as medians (*Mdn)* with interquartile range (Q1, Q3). Categorical variables were reported as counts (n) and percentages (%).The differences between two groups were assessed using the Wilcoxon rank-sum test, with effect size estimated using the rank-biserial correlation ($\hat{r}^{rank}_{biserial}$). Effect sizes were interpreted based on Funder's Convention. The significance of the association between the two numerical variables was determined using Spearman correlation coefficient. The p-values were computed using the AS 89. Determination and evaluation of optimal cutpoints for CHI3L1 between disease group severity levels were performed in a robust manner using the maximization metric method (sum of specificity and sensitivity) with more or equal ("≥") direction with bootstrapping procedures. Out-of-sample variability and power were assessed using 1000 bootstrap samples. A sample of the same size as the original data was drawn from the original data and replaced. Cut-point estimation was performed for the in-bag sample, and the determined cut-off point was applied to the in-bag and out-of-bag observations.

Results

Characteristics of the Studied Population

Our study included 22 pediatric patients (seven girls and 15 boys) hospitalized for TBE between June 2020 and August 2022. The detailed demographic and clinical characteristics are summarized in Table 1. The cohort was divided

Table 1 Sociodemographic and Clinical Characteristics of Pediatric Patients Hospitalized with Tick-Borne Encephalitis (TBE)

Characteristic	N	Overall distribution N = 22*
Sociodemographic data		
Sex	22	
Female		7.0 (31.8%)
Male		15.0 (68.2%)
Age [years]	22	11.1 (7.2, 15.4)#
Clinical data on admission		
Clinical picture	22	
Meningoencephalitis		6.0 (27.3%)
Meningitis		16.0 (72.7%)
Disease severity scale	22	13.5 (9.2, 16.8)#
Disease severity groups	22	
Mild (0–8 score)		4.0 (18.2%)
Moderate (9–22 score)		15.0 (68.2%)
Severe (23+ score)		3.0 (13.6%)
Headache [days]	22	6.0 (3.0, 7.0)#
Fever [days]	22	6.0 (4.0, 7.0)#
Vomiting [days]	22	1.5 (1.0, 3.0)#
Tremor [days]	22	12.0 (54.5%)
Mannitol treatment [days]	22	4.0 (4.0, 5.0)#
Length of hospital stay [days]	22	17.5 (14.0, 19.0)#
CRP in serum [mg/L]	22	5.5 (1.1, 11.2)#
WBC in blood [x10^3/mcL]	22	11.7 (9.1, 14.4)#
Lymphocytes in blood [%]	22	20.0 (12.9, 27.2)#
ALC in blood [cells/mcL] $\times 10^3$	22	2.14 (1.76, 3.57)#
Neutrophils in blood [%]	22	71.2 (58.4, 80.2)#
ANC in blood [cells/mcL] $\times 10^3$	22	9.18 (4.48, 10.78)#
CSF parameters on admission:		
CSF cells / µL	22	102 (72, 167)#
CSF protein, mg/dL	22	37.5 (26.3, 57.2)#
CSF lymphocytes, %	22	59 (45, 73)#
CSF lymphocytes, cells/ / µL	22	55 (28, 122)#
CSF neutrophils, %	22	30 (14, 40)#

(*Continued*)

Table 1 (Continued).

Characteristic	N	Overall distribution N = 22*
CSF neutrophils, cells / µL	22	25 (15, 36)#
CSF monocytes, %	22	11 (2, 15)#
CSF monocytes, cells / µL	22	8 (4, 20)#
CSF parameters after treatment:		
CSF cells/ µL	22	33 (20, 61)#
CSF protein, mg/dL	22	37.5 (26.3, 57.2)#

Note: *n (%); #Mdn (Q1, Q3).
Abbreviations: CRP, C-reactive protein; WBC, white blood cells; ALC, absolute lymphocyte count in blood; ANC, absolute neutrophil count in blood.

based on clinical diagnosis: 6 with meningoencephalitis (1 female, 5 males) and 16 with meningitis (6 females, 10 males). Disturbances in consciousness were exclusive to the encephalitis subset. Neurological manifestations included tremor (12/22), unsteady gait (1/22), photophobia (5/22), emotional lability (3/22), and generalized seizures (2/22). On average, all participants experienced headaches lasting 6 days. Fever was noted in of the 21/22 subjects with an average duration of 6 days (range 10–23 days), and vomiting was reported in 17 patients. Treatment protocols included mannitol (15%) administered 2–4 times daily for 3–5 days, complemented by NSAIDs, as required by European Academy of Neurology.[7] The median length of the hospital stay was 17.5 days. Laboratory assessments revealed normal or slightly elevated levels of CRP and white blood cells, with neutrophils predominating in most cases. On the basis of the numerical disease severity scale, most cases were moderate (15/22), with the remainder classified as mild (4/22) or severe (3/22). None of the patients experienced long-term complications.

Pre-post treatment differences in concentrations of chitinase-3-like 1 and other cytokines in the CSF and serum

Protein detectability varied, with some cytokines, such as IFN-γ, IL-4, IL-13, and IL-1 beta only occasionally detectable in the serum and more frequently in the CSF. Regarding the serum samples, IFN-γ was detected in one T1 sample and two T2 samples only, IL-4 in three T1 samples and one T2 sample, and IL-13 and IL-1 beta were undetectable in both T1 and T2 serum samples. The detectability of proteins in CSF samples was higher: IL-13 was detected in one patient on T1 and two on T2, IL-1 beta was detected in three patients on T1, and none on T2. While CXCL-2 was detectable in all serum samples and 12 T1 CSF samples, it was detected in three CSF samples collected on T2 only. This limits the calculation of CSF/serum quotients and indices. We could not calculate CSF/serum quotients and indices for CXCL2 and IL-4 on T2, IL-1 beta, IL-13 and INF-γ on both T1 and T2. The baseline and posttreatment protein concentrations are shown in Table 2.

Significant reductions in CSF CHI3L1 levels were observed post-treatment (p=0.009), especially in meningitis but not in encephalitis (Figures 1 and 2). However, serum CHI3L1 levels did not exhibit statistically significant changes. Similarly, no significant differences were observed in the CHI3L1 CSF/serum quotient and index values between the two time points.

Additionally, a greater decrease in CHI3L1 serum level at the time point after 2 weeks was significantly correlated with more severe headache (rho = −0.46, p =0.031, n_{pairs} = 22), while a significantly greater decrease in CSF was observed among girls (median = -1.84×10^3 (Q1 = -3.68×10^3, Q3 = 0.67×10^3) compared to boys (median = -1.56×10^3 (Q1 = -2.39×10^3, Q3 = 1.49×10^3), p = 0.047, n = 22). Second, we observed a significant correlation between a greater decrease in the CHI3L1 quotient at the time point after two weeks with a longer intake of mannitol (rho = −0.45,

Table 2 Serum and Cerebrospinal Fluid Biomarker Levels Upon Admission and After Two Weeks of Treatment in Pediatric TBE Patients

Characteristic*	**N**	**Time point**		**P#**
		Baseline, n = 22	**Post-treatment, n = 22**	
Chitinase 3-like 1 in serum [ng/mL]	44	22.1 (18.2, 28.8)	17.9 (15.4, 31.8)	0.338
Chitinase 3-like 1 in CSF [ng/mL]	44	182.6 (166.9, 217.3)	150.6 (139.5, 190.3)	**0.008**
Chitinase 3-like-1 Q	44	8.8 (6.3, 10.5)	8.0 (4.2, 9.4)	0.355
Chitinase 3-like-1 index	44	1.4 (0.8, 2.0)	1.2 (0.9, 2.9)	0.306
CCL-2 in serum [pg/mL]	44	191.2 (116.0, 258.1)	275.1 (206.5, 343.0)	**0.017**
CCL-2 in CSF [pg/mL]	44	457.4 (296.3, 805.7)	369.4 (258.8, 438.5)	0.077
CCL-2 Q	44	2.7 (1.6, 4.7)	1.4 (0.9, 2.1)	**<0.001**
CCL-2 index	44	0.4 (0.3, 0.8)	0.3 (0.2, 0.4)	**0.009**
Chemerin in serum [ng/mL]	44	8.51 (6.59, 10.67)	8.69 (7.64, 10.06)	0.570
Chemerin in CSF [ng/mL]	34	1.00 (0.77, 1.37)	0.73 (0.47, 0.96)	0.060
Chemerin Q	34	0.1 (0.1, 0.2)	0.1 (0.1, 0.1)	0.073
Chemerin Index ($\times 10^{-3}$)	34	19.5 (13.2, 24.7)	14.9 (10.2, 25.8)	0.363
CXCL2 serum [ng/mL]	44	1.06 (0.69, 1.42)	0.93 (0.71, 1.24)	0.277
IL-6 in serum [pg/mL]	43	5.8 (3.6, 8.8)	1.2 (0.4, 2.0)	**0.004**
IL-6 in CSF [pg/mL]	44	474.7 (317.0, 725.3)	2.5 (1.8, 3.6)	**<0.001**
IL-6 Q	43	68.1 (38.8, 145.0)	2.0 (1.2, 5.8)	**<0.001**
IL-6 Index	43	13.1 (6.3, 25.2)	0.4 (0.3, 1.1)	**<0.001**
TNF-alpha in serum [pg/mL]	38	5.3 (3.5, 6.2)	5.3 (1.5, 7.8)	0.572
TNF-alpha in CSF [pg/mL]	38	5.5 (2.3, 8.3)	2.9 (1.2, 4.4)	**0.010**
TNF-alpha Q	33	1.1 (0.5, 2.4)	0.6 (0.3, 1.6)	**0.046**
TNF-alpha Index	33	0.2 (0.1, 0.3)	0.1 (0.1, 0.2)	0.116
CSF [cells/μL]	44	101.5 (73.8, 163.5)	32.5 (20.2, 59.0)	**<0.001**
CSF protein [mg/dL]	44	41.0 (34.5, 61.0)	37.5 (26.5, 55.7)	0.357
Albumin CSF [mg/dL]	44	25.1 (21.1, 35.2)	21.9 (15.1, 34.2)	0.249
Albumin serum [g/dL]	44	4.3 (4.1, 4.4)	4.6 (4.4, 4.8)	**0.001**
Albumin Q	44	6.4 (4.9, 8.3)	4.6 (3.3, 7.5)	0.067

Note: *MDN (Q1, Q3), #Wilcoxon rank-sum test. The index was calculated by dividing the Q of the respective protein by the albumin Q, adjusting the CSF concentrations to the blood-brain barrier permeability. Bolded data are statistically significant.
Abbreviations: Q, CSF/serum quotient; CSF, cerebrospinal fluid; TNF, tumor necrosis factor; IL-6, interleukin-6; CCL-2, Chemokine (C-C motif) ligand 2; CXCL2, Chemokine (C-X-C motif) ligand 2.

p =0.034, n_{pairs} = 22). Finally, a greater decrease in the CHI3L1 index value after treatment was significantly correlated with shorter hospitalizations (rho = 0.47, p =0.026, n_{pairs} = 22).

The levels of other cytokines in the CSF, including IL-6 and TNF-α, decreased post-treatment. There was also a decreasing trend in the CCL-2 and chemerin concentrations in the CSF. Serum concentrations of these proteins were

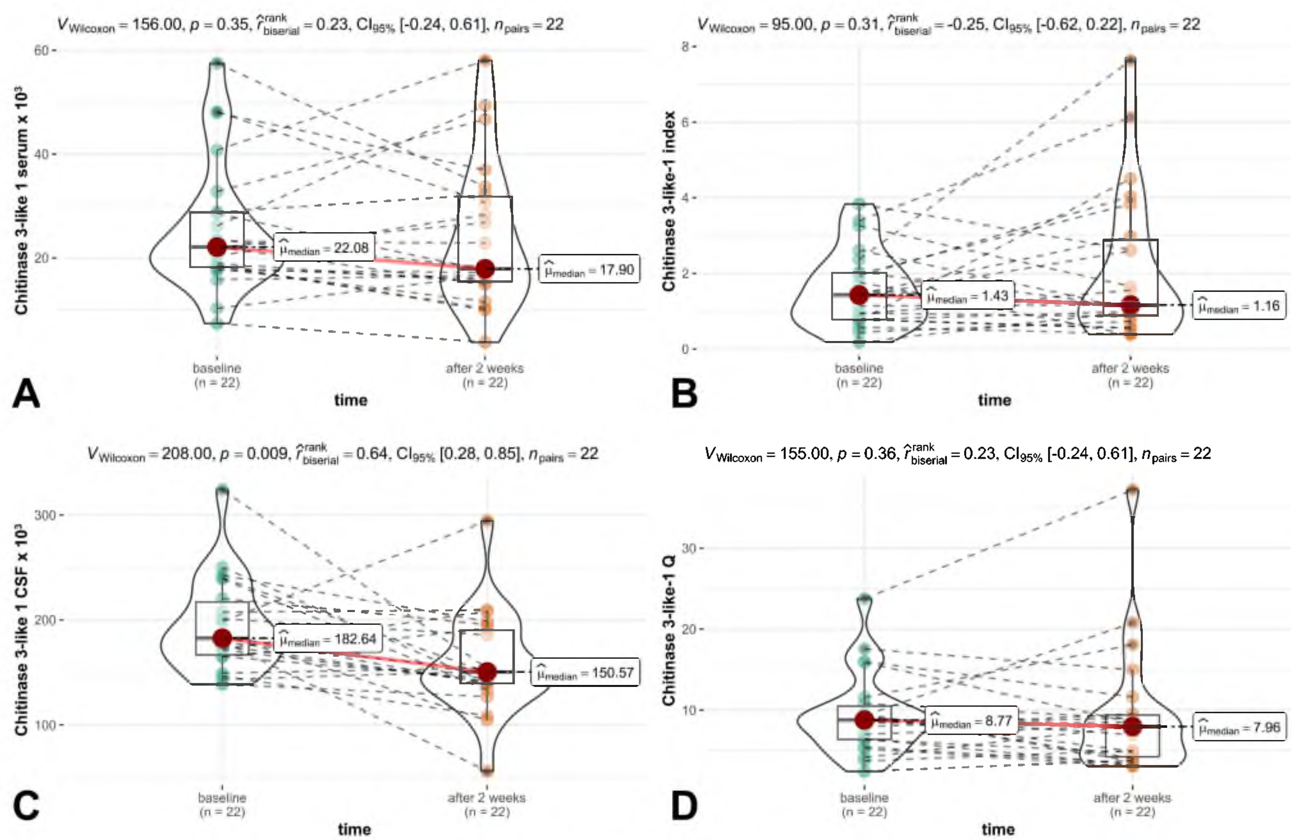

Figure 1 Violin and box plots illustrating the distribution of chitinase 3-like-1 concentrations in serum (**A**) and cerebrospinal fluid CSF (**C**) from patients diagnosed with encephalitis and meningitis, both at baseline and two weeks post-treatment. (**B**) shows the CSF/serum quotient (Q) of chitinase 3-like-1, calculated by dividing the concentration in CSF by the concentration in serum, while (**D**) presents the chitinase 3-like-1 index, calculated by dividing the Q of chitinase 3-like-1 by the albumin Q to account for blood-brain barrier integrity. Each violin plot includes individual data points, a box plot overlay indicating the interquartile range, median values (red dashed line and labeled in the center), and connecting lines between individual patient measurements to indicate paired changes over time. Statistical values, including the Wilcoxon signed-rank test results, p-values, rank biserial correlations, and 95% confidence intervals, are displayed above each plot.
Abbreviations: CSF, cerebrospinal fluid; Q, CSF/serum quotient.

inconsistent: CCL-2 increased (p=0.017) and IL-6 decreased (p=0.004); serum concentrations of chemerin and CXCL2 did not change over the course of two weeks. There was however a significant reduction of CCL-2 Q and index values, as well as IL-6 Q and index, and TNF-α Q. We found a correlation between a greater decrease in the IL-6 quotient and index after two weeks with a longer intake of mannitol (respectively: rho = −0.57, p =0.006, n_{pairs} = 21; and rho = −0.52, p =0.016, n_{pairs} = 21). The decrease of CCL2 and TNF-α markers were not correlated with clinical presentation.

Severity-Dependent Variations in CHI3L1 Levels

The CHI3L1 index values differed significantly between encephalitis and meningitis, with lower levels in encephalitis (Table 3). Lower values were also found for the CHI3L1 quotient in encephalitis, but only at the trend level (p<0.10). It can be assumed that this result was probably due to the increased albumin quotient in encephalitis cases. Nevertheless, a large effect size was obtained in both cases ($\hat{r}^{rank}_{biserial}$ = 0.73 and 0.54 respectively). There were no significant differences in the levels of the CHI3L1 in CSF and serum, quotient, or index values according to the severity scale.

Regarding other analyzed cytokines, there was a strong negative correlation between IL-4 in CSF and the numerical severity score (rho= –0.63; p=0.014). Concentrations of other cytokines in the CSF and serum, as well as their quotient and index values, did not differ between the severity groups and did not correlate with the disease severity.

CHI3L1 index discriminated between encephalitis and meningitis. The calculated cutoff value of 0.95 for the chitinase 3-like-1 index suggests that individuals with a value of 0.95 or less are at high risk for tick-borne encephalitis, with strong sensitivity and specificity metrics (Table 4). Conversely, individuals with values greater than 0.95 were

https://doi.org/10.2147/JIR.S480556

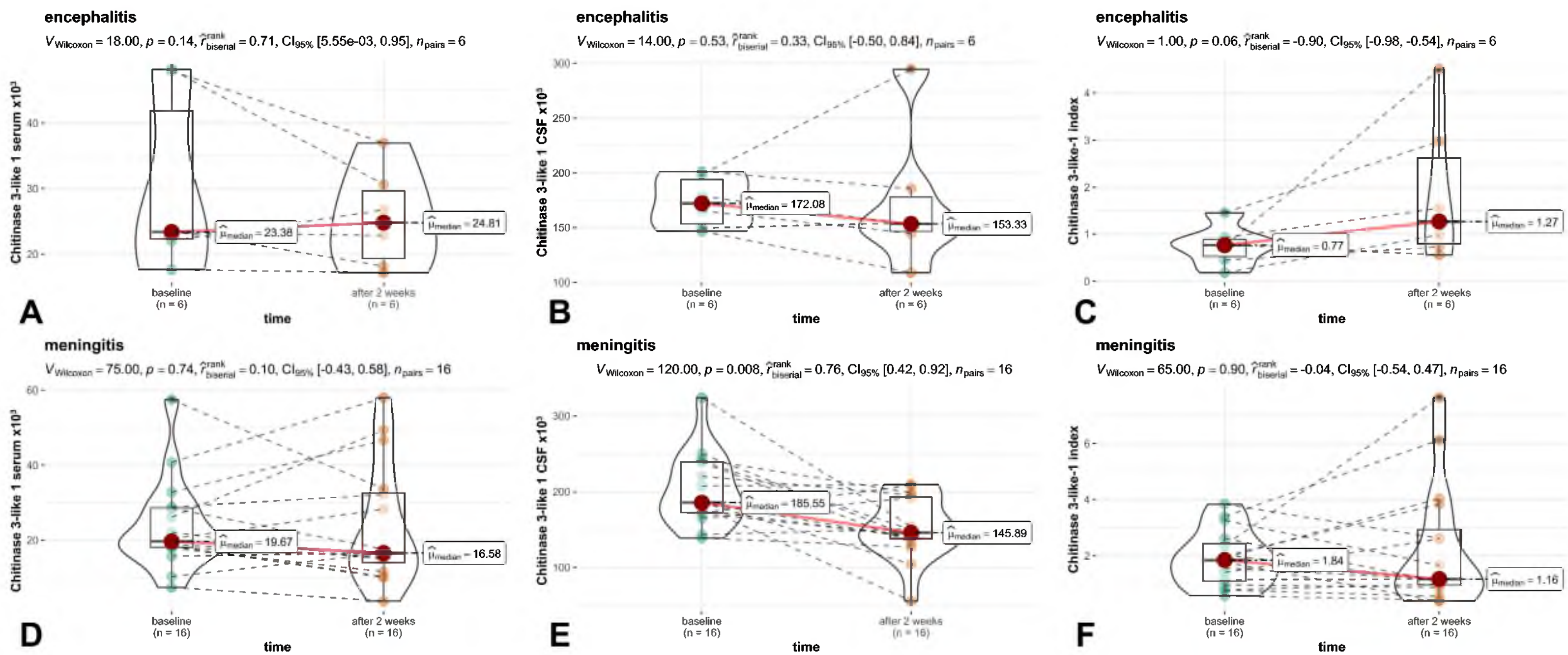

Figure 2 Violin and box plots depicting chitinase 3-like-1 levels in serum and cerebrospinal fluid, and calculated indices stratified by disease severity (encephalitis and meningitis) at baseline and after two weeks. (**A–D**) represent chitinase 3-like-1 levels in serum, (**B–E**) show levels in CSF, while (**C–F**) present the chitinase 3-like-1 index, which is the CSF/serum quotient (Q) of chitinase 3-like-1 normalized by the albumin Q to adjust for blood-brain barrier permeability. Each panel includes individual data points, median values (highlighted with red dashed lines and labeled for clarity), and connecting dashed lines for individual patients to illustrate paired changes over time. Wilcoxon signed-rank test statistics, p-values, rank biserial correlations, and 95% confidence intervals are annotated above each plot.

Abbreviations: CSF, cerebrospinal fluid; Q, CSF/serum quotient.

Table 3 Distribution of Analyzed Proteins in CSF and Serum at Baseline, Stratified by Disease Severity (Encephalitis Vs Meningitis) Among Pediatric TBE Patients. Statistical Comparisons Indicate Differences Between the Encephalitis and Meningitis Groups

Characteristic	N	Clinical picture		P#
		Encephalitis, n = 6*	Meningitis, n = 16*	
CSF cells [cells/µL]	22	286.5 (143, 405)	86.5 (57, 136.5)	0.014
CSF protein [mg/dL]	22	60 (43, 76)	38.05 (31.5, 46)	0.032
CSF lymphocytes, %	22	69.5 (58, 83)	56.5 (39, 72)	0.367
CSF lymphocytes, cells/µL	22	133.9 (51.1, 201.3)	42.7 (26.0, 71.6)	0.098
CSF neutrophils, %	22	15.5 (12, 40)	30 (27, 42)	0.424
CSF neutrophils, cells/µL	22	31.3 (24.3, 82.6)	30.0 (27.0, 42.0)	0.261
CSF monocytes, %	22	1.5 (0.0, 15)	12 (6.5, 19.5)	0.203
CSF monocytes, cells/µL	22	6.4 (0.0, 10.5)	8.4 (4.5, 21.5)	0.261
Albumin Q	22	8.81 (6.82, 11.69)	5.48 (4.35, 6.96)	0.017
Chitinase 3-like 1 in serum [ng/mL]	22	23.38 (22.33, 41.88)	19.67 (18.08, 28.57)	0.329
Chitinase 3-like 1 in CSF [ng/mL]	22	172.08 (153.40, 193.70)	185.55 (172.32, 239.42)	0.231
Chitinase 3-like-1 Q	22	6.67 (4.68, 8.11)	9.31 (7.54, 12.65)	0.059
Chitinase 3-like-1 index	22	0.77 (0.52, 0.89)	1.84 (1.09, 2.43)	0.008
CCL-2 in serum [pg/mL]	22	190.64 (106.35, 268.04)	191.17 (123.88, 230.15)	0.796
CCL-2 in CSF [pg/mL]	22	457.44 (302.96, 769.87)	425.88 (287.04, 1215.2)	0.971
CCL-2 Q	22	2.74 (1.70, 4.57)	3.09 (1.49, 6.57)	0.685
CCL-2 index	22	0.42 (0.27, 0.78)	0.41 (0.08, 0.96)	0.796
INF-gamma in CSF [pg/mL]	14	42.46 (22.81, 65.37)	28.82 (11.1, 78.11)	0.561
IL-4 in CSF [pg/mL]	15	19.48 (18.14, 23.24)	23.24 (18.14, 37.91)	0.391
Chemerin in serum [ng/mL]	22	8.77(6.18, 11.40)	7.74 (7.22, 10.42)	0.941
Chemerin in CSF [ng/mL]	19	0.95 (0.77, 1.26)	1.42 (0.66, 2.25)	0.342
Chemerin Q	19	0.1 (0.08, 0.14)	0.19 (0.11, 0.29)	0.211
Chemerin index	19	0.02 (0.01, 0.02)	0.02 (0.01, 0.04)	0.653
CXCL2 in serum [pg/mL]	22	1185.28 (777.44, 1392.57)	647.99 (610.2, 1594.99)	0.285
CXCL2 in CSF [pg/mL]	12	39.67 (26.25, 73.13)	70.27 (33.7, 75.87)	0.626
CXCL2 Q	12	0.03 (0.02, 0.08)	0.05 (0.04, 0.06)	0.329
CXCL2 index	12	0.007 (0.003, 0.001)	0.006 (0.004, 0.008)	1.000
IL-6 in serum [ng/mL]	22	6.58 (3.94, 8.79)	3.94 (2.0, 8.79)	0.417
IL-6 in CSF [ng/mL]	22	447.79 (302.55, 610.81)	826.56 (331.13, 1147.69)	0.224
IL-6 Q	22	68.14 (35.63, 117.32)	264.65 (37.67, 609.67)	0.439
IL-6 index	22	13.13 (6.59, 21.74)	16.62 (6.22, 58.59)	0.580

(*Continued*)

Table 3 (Continued).

Characteristic	N	Clinical picture		P[#]
		Encephalitis, n = 6*	Meningitis, n = 16*	
TNF-alpha in serum [ng/mL]	17	4.46 (3.54, 6.18)	5.34 (3.96, 5.55)	0.865
TNF-alpha in CSF [ng/mL]	22	5.07 (1.77, 7.09)	7.43 (5.45, 12.03)	0.140
TNF-alpha Q	17	1.04 (0.36, 2.69)	1.94 (1.04, 2.33)	0.610
TNF-alpha index	17	0.15 (0.09, 0.32)	0.15 (0.08, 0.3)	0.777

Note: *MDN (Q1, Q3), [#]Wilcoxon rank-sum test. The index was calculated by dividing the Q of the respective protein by the albumin Q.
Abbreviations: Q, cerebrospinal fluid/serum quotient; CSF, cerebrospinal fluid; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; CCL-2, chemokine (C-C motif) ligand 2; CXCL2, Chemokine (C-X-C motif) ligand 2.

Table 4 Results of Optimal Cut-off Point Estimation for Differentiating Between Meningitis and Encephalitis in Pediatric TBE Patients, Based on the Chitinase 3-Like-1 Index and CSF/Serum Quotient (Q) Values. The Table Provides Accuracy, Sensitivity, Specificity, and Area Under the Receiver Operating Characteristic Curve (AUC) Metrics for Each Predictor

Predictor	Optimal cutpoint	Accuracy	Sensitivity	Specificity	AUC
Chitinase 3-like-1 index	0.95	0.82	0.81	0.83	0.86
Chitinase 3-like-1 Q	9.28	0.68	0.56	1.00	0.77

Abbreviation: AUC, area under the receiver operating characteristic curve.

classified as being at low risk for encephalitis. In contrast, the estimated cutoff value for CHI3L1 Q did not allow for a good differentiation of patients with encephalitis.

Interconnections Between CHI3L1 and Other Variables

The correlation analysis highlighted in Table 5 provides key insights into the interplay between CHI3L1 and other biomarkers, underscoring its significant role in the neuroinflammatory processes characteristic of TBE. Notably, CHI3L1 levels in the

Table 5 Spearman Correlation Coefficients Between Chitinase-3-Like 1 Protein and Other Measured Parameters in Serum and CSF in Pediatric TBE Patients

	Parameter	N_{pairs}	Rho	P
Chitinase 3-like 1 serum vs.	Albumin serum (g/dL)	44	−0.39	0.008
	Albumin Q	44	0.30	0.049
Chitinase 3-like 1 CSF vs.	Chemerin CSF	34	0.42	0.005
	Chemerin Q	34	0.40	0.008
	IL-6 CSF	44	0.43	0.004
	IL-6 Q	43	0.40	0.007
	IL-6 Index	43	0.37	0.013
	TNF alpha CSF	33	0.31	0.039
	CSF cells/mcL	44	0.32	0.033

(*Continued*)

Table 5 (Continued).

	Parameter	N_{pairs}	Rho	P
Chitinase 3-like-1 index vs.	TNF alpha CSF	33	−0.32	0.034
	Chemerin Index	34	0.41	0.006
	CSF protein [mg/dL]	44	−0.57	<0.001
	Albumin CSF (mg/dL)	44	−0.56	<0.001
	Albumin serum (g/dL)	44	0.41	0.006
	Albumin Q	44	−0.62	<0.001

Notes: The index was calculated by dividing the Q of the respective protein by the albumin Q.
Abbreviations: Q, cerebrospinal fluid/serum quotient; CSF, cerebrospinal fluid; TNF, tumor necrosis factor; IL-6, interleukin-6.

serum and CSF exhibited diverse correlation patterns with biomarkers, such as albumin, chemerin, IL-6, and TNF-α. For instance, a strong negative correlation between CHI3L1 serum levels and serum albumin (rho = −0.39, p = 0.008) contrasts with the positive correlations observed with the same biomarkers in the CSF. Additionally, positive correlations of CHI3L1 in the CSF with pro-inflammatory cytokines such as IL-6 (rho = 0.43, p = 0.004) and TNF-α (rho = 0.31, p = 0.039), and with the chemokine chemerin (rho = 0.42, p = 0.005), highlighted its involvement in mediating inflammatory responses within the central nervous system. A detailed correlation analysis is provided in the supplementary files.

Brain-Blood Barrier Permeability in TBE

Elevated albumin Q levels, indicating a disrupted BBB permeability, were observed in 16 children (10/16 children with meningitis and 6/6 children presenting as encephalitis). Median albumin Q on admission was 6.40 (IQR; 4.9, 8.3). When the symptoms resolved this marker dropped to median 4.6 (IQR; 3.3, 7.5), but the difference did not reach statistical significance (p=0.067). In children diagnosed with encephalitis, the median albumin quotient decreased from 8.8 (interquartile range [IQR] 6.8–11.7) at T1 to 4.9 (IQR 3.0–8.1) at T2 (p=0.046). This decrease indicates an improvement in BBB integrity over the course of treatment. In contrast, in meningitis cases, the albumin Q values remained constant between the two time points. This is because albumin Q normalized at T2 in 10 of 16 children with elevated albumin Q on T1 (that includes 7 meningitis and 3 encephalitis cases), Albumin Q remained elevated in the remaining 6 children (3 meningitis and 3 encephalitis cases). In 3 children with normal albumin Q on T1, it remained normal on T2. In the other 3 children albumin Q increased on T2, despite being normal on T1.

Normalization of albumin Q was associated with younger age (median 6.3; IQR, 4.4, 12.8 vs median 16.0 years; IQR, 14.3, 16.9; p=0.034), lower IL-6 Q on T1 (median 39.9; IQR, 20.5, 112.6; vs median, 401.3; IQR, 110.6, 609.7; p=0.01), and lower IL-6 index (median 6.2; IQR, 2.2, 12.7 vs median, 42.7; IQR, 16.0, 59.9; p=0.007), There were no differences in clinical presentation and concentrations of other chemokines and cytokines between children who have and have not normalized albumin Q after treatment.

Children diagnosed with encephalitis had a higher albumin Q than those diagnosed with meningitis (p=0.032), indicating increased BBB permeability. In order to further investigate BBB permeability in TBE we created the correlation matrix. The analysis revealed that CHI3L1 serum levels and CHI3L1 index values (but not CSF CHI3L1 concentrations) were positively correlated with albumin Q (p=0.007 and p<0.001, respectively). Among the CSF cytokines, there were strong positive correlations between the albumin Q and IL-4, IL-6, and TNF-α (see Supplementary Table 1).

Discussion

TBE is a significant public health concern, particularly in regions where the causative virus is endemic. Pediatric cases of TBE present unique challenges owing to the developing nature of the central nervous system and potential for long-term neurological sequelae. In recent years, researchers have explored the utility of biomarkers for enhancing the diagnosis, prognosis, and treatment monitoring of TBE. Cytokines and chemokines are small proteins that play crucial roles in cell signaling and communication within the immune system. They are involved in various physiological processes including inflammation and immune responses. One of the biomarkers for TBE is chitinase 3-like-1.

CHI3L1, also known as human cartilage glycoprotein-39 (HC-gp39) or YKL-40, is a glycoprotein secreted by various cell types including macrophages, neutrophils, and chondrocytes in response to inflammation and tissue remodeling.[31] Its involvement in neuroinflammatory processes has sparked interest in its potential as a biomarker for neurological disorders including TBE.

In viral infections affecting the central nervous system, various cytokines and chemokines limit viral replication and ultimately control the spread of the virus. However, the accumulation of proinflammatory mediators in the CNS may also result in progressing the severity of encephalitis and consequently cause permanent neuronal damage.[17,32,33] In the context of TBE, elevated CHI3L1 levels may reflect the extent of neuroinflammation and neuronal damage, thereby providing valuable insight into disease pathogenesis and progression. Recent studies have indicated that CHI3L1 plays a major role in tissue injury, inflammation, repair, and remodeling responses. It has been strongly associated with diseases including asthma, arthritis, sepsis, diabetes, liver fibrosis, coronary artery disease, ischemic stroke and Alzheimer's disease, and could even provide a useful inflammatory marker for patients with toxoplasmosis or Kawasaki disease. More importantly, CHI3L1 has been proven to be independently associated with poor outcomes, disease severity, progression, and an unfavorable course of these diseases.[34–38]

In the current study, our main goal was to examine the role of CHI3L1 in TBE in children and to assess the influence of various pro- and anti-inflammatory cytokines that could affect the production of CHI3L1. While some children experience mild symptoms and recover fully, others develop severe neurological complications including meningitis, encephalitis, and long-term cognitive impairment. However, the underlying factors that contribute to this variability remain poorly understood. Biomarkers such as CHI3L1 offer potential means for elucidating these mechanisms. Czupryna et al discovered that CHI3L1 concentration in the CSF of adult patients with TBE was significantly higher in patients with meningitis and was associated with a milder course of the disease. They concluded that this biomarker was not useful for the prognosis of sequelae development, as both serum and CSF CHI3L1 concentrations were comparable in patients who recovered completely and in those with an unfavorable course.[39] In our study, significant reductions in CSF CHI3L1 levels were observed post-treatment, which were especially pronounced in meningitis cases. We showed significantly lower CHI3L1 index values in encephalitis cases than in meningitis cases, which suggests that CHI3L1 is associated with a milder course of TBE in children. Additionally, a greater decrease in CHI3L1 serum levels post-treatment was significantly correlated with more severe headache and, consequently, a longer intake of mannitol. A greater decrease in CHI3L1 index after treatment was significantly correlated with shorter hospitalization, which could indicate that CHI3L1 play a major role in the recovery process.

In our study, we also showed that a wide range of cytokines and chemokines were produced in response to TBEV infection. It has been shown that in the pediatric population, concentrations of particularly IL-6, TNF-α, and IFN-γ increase in CSF or serum in CNS infections of different etiologies.[40–42] This finding is consistent with our results. Importantly, we found that CHI3L1, IL-6, and TNF-α concentrations were highest at the beginning of the disease and decreased during the course of the infection. Elevated levels of cytokines in the CSF, particularly IL-6 and TNF-α, have been associated with more severe cases of viral meningitis and encephalitis in children. These cytokines are generally known to promote inflammation in CSN and contribute to poor neurological outcome.[13,43,44] In our study a positive correlation with CHI3L1 was established among children with encephalitis. It is worth noting that there is a lack of studies that correlate mediator concentrations with the clinical picture in the pediatric population.

In the case of TBE, the exact mechanisms by which TBEV breach the BBB are not yet fully understood; however, different strategies have been postulated. For instance, the virus can enter the CNS by direct infection of the peripheral nerves and olfactory neurons through transcellular and paracellular entry into the endothelial cells of the BBB. The Trojan horse" mechanism and cytokine-mediated BBB breakdown also play vital roles in altering

BBB.[45,46] The results of our study suggest that infection with TBE causes the breakdown of the BBB, which is consistent with the results of similar studies. Increased levels of certain cytokines in the CSF have been observed in both animal and human studies, and their connection with BBB disruption of the BBB were established.[45,47,48] TNF-α is a potent pro-inflammatory cytokine that directly affects the integrity of the BBB by increasing the permeability of endothelial cells and promoting the expression of adhesion molecules. TNF-α also stimulates the production of other cytokines and chemokines, which further contributes to BBB disruption.[40] Second, IL-6 induces the expression of adhesion molecules in endothelial cells, thereby facilitating the migration of immune cells across the BBB. In addition, IL-6 can enhance the production of acute-phase proteins and is associated with poor neurological outcome.[40,49] It is worth mentioning IFN-gamma - A cytokine that is primarily produced by activated T cells and natural killer (NK) cells. It plays a crucial role in antiviral defense but can also contribute to BBB disruption by inducing the expression of adhesion molecules on endothelial cells.[50] In our study, we found that the albumin quotient decreased after treatment in cases of encephalitis. This suggests that the blood-brain barrier responds differently in encephalitis compared to meningitis. The differences in the index result from differences in the permeability of the BBB corresponding to the degree of damage, and provide insight into how the virus affects the BBB. Additionally, we found strong positive correlations between the albumin quotient and the levels of IL-4, IL-6, and TNF-α in the CSF. This indicates that as the albumin quotient increases, which reflects blood-brain barrier permeability, the concentrations of these inflammatory cytokines also rise. The correlation with IL-4 suggests a relationship with T-helper cell responses, while the associations with IL-6 and TNF-α highlight the involvement of pro-inflammatory pathways in the context of central nervous system inflammation. These findings may imply that increased blood-brain barrier permeability is associated with heightened inflammatory activity in the CSF, potentially reflecting the severity of the underlying condition.It is important to note that BBB disruption is independent of CD8+ T cells and occurs when CNS viremia is high.[47]

Therefore, the results of this study should be interpreted with caution. The examined group was relatively small, and in order to use these cytokines and chemokines in clinical practice, it would be necessary to establish age-correlated cutoff values. Although we excluded children with chronic diseases, the expression of chemokines/cytokines was linked to individual determinants, which requires further investigation. Moreover, obtaining CSF from healthy children is exceptionally restricted and these limitations are related to ethical reasons. Consequently, concentrations of the chemokines discussed in the CSF can only be compared with those in children who were admitted to the hospital with signs suggesting possible neuroinvasive infections that were subsequently excluded.

However, the advantage of our study is that it is a rare, clinically and microbiologically well-defined group of 22 children with TBE. We provide precise laboratory data. Concentrations of pro-/anti-inflammatory biomarkers were measured both in CSF and serum, and further adjusted to the albumin quotient. The study lacks control group of healthy individuals, but we used a within-subject design, where each patient served as their own control to assess changes over time. This approach allowed us to evaluate the temporal changes associated with disease progression and response to treatment, as observed in the significant reductions in CSF levels of certain markers post-treatment.

Conclusion

Our findings suggest that CHI3L1 is involved in the pathogenesis of TBE in children, however, causative relationships cannot be established in this observational study. We further point out that lower CHI3L1 CSF levels were observed in severe cases of TBE, supporting the potential utility of this protein as a marker for disease severity. Additionally, we identified significant interactions between CHI3L1 and other cytokines, specifically chemerin, IL-6, and TNF-α. Although the levels of chemerin remained stable over time, levels of CHI3L1, IL-6, and TNF-α decreased as clinical symptoms resolved. In summary, this study provides valuable insights into the immunopathological mechanisms of pediatric TBE and thus points to CHI3L1 and associated cytokines as the potential modulators of neuroinflammation and variability in the course of the disease.

Data Sharing Statement

Data available on reasonable request.

Ethical Approval

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved by the Local Bioethics Committee of the Medical University of Bialystok (approval number APK.002.545.2023). All procedures performed in this study were undertaken as a part of routine clinical practice. Each patient was informed of the purpose of the study and written consent was obtained from their parents or caregivers.

Funding

This research was supported by the Medical University of Bialystok, Poland (to A.S. grant no. B.SUB.24.447). The funders played no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or manuscript preparation.

Disclosure

Professor Robert Flisiak reports grants, personal fees, non-financial support, Advisory from AbbVie, grants, personal fees, non-financial support, Advisory from Gilead, grants, personal fees, Advisory from Pfizer, grants from Roche, personal fees, non-financial support, Advisory from Novavax, Advisory from Novo Nordisk, outside the submitted work. The author reports no other conflicts of interest in this work.

References

1. Królasik A, Paradowska-Stankiewicz I. Meningitis and encephalitis in Poland in 2016. *Przegl Epidemiol*. 2018;72(3):293–301. doi:10.32394/pe.72.3.6
2. Bogovic P. Tick-borne encephalitis: a review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *WJCC*. 2015;3(5):430. doi:10.12998/wjcc.v3.i5.430
3. Czupryna P, Grygorczuk S, Pancewicz S, et al. Evaluation of NSE and S100B in patients with tick-borne encephalitis. *Brain Behav*. 2018;8(12):e01160. doi:10.1002/brb3.1160
4. Bogovič P, Stupica D, Rojko T, et al. The long-term outcome of tick-borne encephalitis in Central Europe. *Ticks Tick-Borne Dise*. 2018;9(2):369–378. doi:10.1016/j.ttbdis.2017.12.001
5. Paradowska-Stankiewicz I, Pancer K, Poznańska A, et al. Tick-borne encephalitis epidemiology and surveillance in Poland, and comparison with selected European countries before and during the COVID-19 pandemic, 2008 to 2020. *Eurosurveillance*. 2023;28(18). doi:10.2807/1560-7917.ES.2023.28.18.2200452
6. COMMISSION IMPLEMENTING DECISION (EU) 2018/ 945 - of - on the communicable diseases and related special health issues to be covered by epidemiological surveillance as well as relevant case definitions.
7. Taba P, Schmutzhard E, Forsberg P, et al. EAN consensus review on prevention, diagnosis and management of tick-borne encephalitis. *Eur J Neurol*. 2017;24(10):1214–e61. doi:10.1111/ene.13356
8. Günther G, Haglund M, Lindquist L, Sköldenberg B, Forsgren M. Intrathecal IgM, IgA and IgG antibody response in tick-borne encephalitis. Long-term follow-up related to clinical course and outcome. *Clin Diagn Virol*. 1997;8(1):17–29. doi:10.1016/S0928-0197(97)00273-0
9. Stone ET, Pinto AK. T Cells in Tick-Borne Flavivirus Encephalitis: a Review of Current Paradigms in Protection and Disease Pathology. *Viruses*. 2023;15(4):958. doi:10.3390/v15040958
10. Yin R, Yang L, Hao Y, et al. Proteomic landscape subtype and clinical prognosis of patients with the cognitive impairment by Japanese encephalitis infection. *J Neuroinflammation*. 2022;19(1):77. doi:10.1186/s12974-022-02439-5
11. Růžek D, Vancová M, Tesařová M, Ahantarig A, Kopecký J, Grubhoffer L. Morphological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection. *J Gen Virol*. 2009;90(7):1649–1658. doi:10.1099/vir.0.010058-0
12. Haglund M, Günther G. Tick-borne encephalitis—pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine*. 2003; 21:S11–S18. doi:10.1016/S0264-410X(02)00811-3
13. Østergaard C, Johansen JS, Benfield T, Price PA, Lundgren JD. YKL-40 Is Elevated in Cerebrospinal Fluid from Patients with Purulent Meningitis. *Clin Vaccine Immunol*. 2002;9(3):598–604. doi:10.1128/CDLI.9.3.598-604.2002
14. Chen J, Ding Y, Zheng D, et al. Elevation of YKL-40 in the CSF of Anti-NMDAR Encephalitis Patients Is Associated With Poor Prognosis. *Front Neurol*. 2018;9:727. doi:10.3389/fneur.2018.00727
15. Dorcet G, Benaiteau M, Pariente J, et al. Cerebrospinal fluid YKL-40 level evolution is associated with autoimmune encephalitis remission. *Clin & Trans Imm*. 2023;12(3):e1439. doi:10.1002/cti2.1439
16. Baldacci F, Lista S, Palermo G, Giorgi FS, Vergallo A, Hampel H. The neuroinflammatory biomarker YKL-40 for neurodegenerative diseases: advances in development. *Expert Revi Proteo*. 2019;16(7):593–600. doi:10.1080/14789450.2019.1628643
17. Bardina SV, Lim JK. The role of chemokines in the pathogenesis of neurotropic flaviviruses. *Immunol Res*. 2012;54(1–3):121–132. doi:10.1007/s12026-012-8333-3
18. Grygorczuk S, Świerzbińska R, Kondrusik M, et al. The intrathecal expression and pathogenetic role of Th17 cytokines and CXCR2-binding chemokines in tick-borne encephalitis. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):115. doi:10.1186/s12974-018-1138-0

19. Zajkowska J, Moniuszko-Malinowska A, Pancewicz S, et al. Evaluation of CXCL10, CXCL11, CXCL12 and CXCL13 chemokines in serum and cerebrospinal fluid in patients with tick borne encephalitis (TBE). *Adv Med Sci*. 2011;56(2):311–317. doi:10.2478/v10039-011-0033-z
20. Guziejko K, Czupryna P, Pancewicz S, et al. Analysis of CCL-4, CCL-17, CCL-20 and IL-8 concentrations in the serum of patients with tick-borne encephalitis and anaplasmosis. *Cytokine*. 2020;125:154852. doi:10.1016/j.cyto.2019.154852
21. Bogovic P, Logar M, Avsic-Zupanc T, Strle F, Lotric-Furlan S. Quantitative Evaluation of the Severity of Acute Illness in Adult Patients with Tick-Borne Encephalitis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1–5. doi:10.1155/2014/841027
22. Reiber H. External quality assessment in clinical neurochemistry: survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/serum quotients. *Clin Chem*. 1995;41(2):256–263. doi:10.1093/clinchem/41.2.256
23. Ben-Shachar M, Lüdecke D, Makowski D. effectsize: estimation of Effect Size Indices and Standardized Parameters. *JOSS*. 2020;5(56):2815. doi:10.21105/joss.02815
24. Chan Y, Westbrook R, Holmes N. Protecting the Rescorla-Wagner (1972) theory: a reply to Spicer et al. *J Experimental Psyc*. 2021;47:211–215. doi:10.1037/xan0000271
25. Makowski D, Catarino R, Chen M, et al. Synthesising results of meta-analyses to inform policy: a comparison of fast-track methods. *Environ Evid*. 2023;12(1):16. doi:10.1186/s13750-023-00309-y
26. Patil I. Visualizations with statistical details: the "ggstatsplot" approach. *JOSS*. 2021;6(61):3167. doi:10.21105/joss.03167
27. Sjoberg DD, Whiting K, Curry M, Lavery JA, Larmarange J. Reproducible Summary Tables with the gtsummary Package. *R J*. 2021;13(1):570. doi:10.32614/RJ-2021-053
28. Thiele C, Hirschfeld G. cutpointr: improved Estimation and Validation of Optimal Cutpoints in R. *J Stat Soft*. 2021;98(11):1–27. doi:10.18637/jss.v098.i11
29. Wickham H, Averick M, Bryan J, et al. Welcome to the Tidyverse. *JOSS*. 2019;4(43):1686. doi:10.21105/joss.01686
30. Wickham H, François R Dplyr: a Grammar of Data Manipulation; 2014.
31. Shao R. YKL-40 acts as an angiogenic factor to promote tumor angiogenesis. *Front Physiol*. 2013;4. doi:10.3389/fphys.2013.00122
32. Wang K, Deubel V. Mice with Different Susceptibility to Japanese Encephalitis Virus Infection Show Selective Neutralizing Antibody Response and Myeloid Cell Infectivity. *PLoS One*. 2011;6(9):e2244744. doi:10.1371/journal.pone.0024744
33. Denizot M, Neal JW, Gasque P. Encephalitis due to emerging viruses: CNS innate immunity and potential therapeutic targets. *J Infect*. 2012;65(1):1–16. doi:10.1016/j.jinf.2012.03.019
34. Zhang W, Zhou X, Yin J, et al. YKL-40 as a novel biomarker related to white matter damage and cognitive impairment in patients with cerebral small vessel disease. *Brain Res*. 2023;1807:148318. doi:10.1016/j.brainres.2023.148318
35. Li J, Lin J, Pan Y, et al. Interleukin-6 and YKL-40 predicted recurrent stroke after ischemic stroke or TIA: analysis of 6 inflammation biomarkers in a prospective cohort study. *J Neuroinflammation*. 2022;19(1):131. doi:10.1186/s12974-022-02467-1
36. YKL-40 as a novel diagnostic biomarker in Toxoplasmosis. *JPTCP*. 2022;29(2). doi:10.47750/jptcp.2022.932
37. Muszyński P, Groblewska M, Kulczyńska-Przybik A, Kułakowska A, Mroczko B. YKL-40 as a Potential Biomarker and a Possible Target in Therapeutic Strategies of Alzheimer's Disease. *CN*. 2017;15(6). doi:10.2174/1570159X15666170208124324
38. Kim KY, Ahn Y, Kim DY, Kim HS, Kim DS. Elevated serum YKL-40 levels in patients with Kawasaki disease. *Biomarkers*. 2017;22(3–4):326–-330. doi:10.1080/1354750X.2016.1265000
39. Czupryna P, Kulczyńka-Przybik A, Mroczko B, et al. Assessment of the YKL-40 concentration in patients with tick-borne encephalitis. *Ticks Tick-Borne Dise*. 2022;13(2):101895. doi:10.1016/j.ttbdis.2022.101895
40. Fowler Å, Ygberg S, Bogdanovic G, Wickström R. Biomarkers in Cerebrospinal Fluid of Children With Tick-borne Encephalitis: association With Long-term Outcome. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35(9):961–966. doi:10.1097/INF.0000000000001210
41. Sato M, Hosoya M, Honzumi K, et al. Cytokine and Cellular Inflammatory Sequence in Enteroviral Meningitis. *Pediatrics*. 2003;112(5):1103–1107. doi:10.1542/peds.112.5.1103
42. Ichiyama T, Ito Y, Kubota M, Yamazaki T, Nakamura K, Furukawa S. Serum and cerebrospinal fluid levels of cytokines in acute encephalopathy associated with human herpesvirus-6 infection. *Brain Dev*. 2009;31(10):731–738. doi:10.1016/j.braindev.2008.11.005
43. Kamei S, Taira N, Ishihara M, et al. Prognostic value of cerebrospinal fluid cytokine changes in herpes simplex virus encephalitis. *Cytokine*. 2009;46(2):187–193. doi:10.1016/j.cyto.2009.01.004
44. Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Shirabe K, Fukano R, Ichiyama T. Serum and cerebrospinal fluid cytokine profile of patients with 2009 pandemic H1N1 influenza virus-associated encephalopathy. *Cytokine*. 2011;54(2):167–172. doi:10.1016/j.cyto.2011.01.006
45. Dörrbecker B, Dobler G, Spiegel M, Hufert FT. Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host. *Travel Med Infectious Dis*. 2010;8(4):213–222. doi:10.1016/j.tmaid.2010.05.010
46. Růžek D, Dobler G, Mantke OD. Tick-borne encephalitis: pathogenesis and clinical implications. *Travel Med Infectious Dis*. 2010;8(4):223–232. doi:10.1016/j.tmaid.2010.06.004
47. Růžek D, Salát J, Singh SK, Kopecký J. Breakdown of the Blood-Brain Barrier during Tick-Borne Encephalitis in Mice Is Not Dependent on CD8+ T-Cells. *PLoS One*. 2011;6(5):e20472. doi:10.1371/journal.pone.0020472
48. Atrasheuskaya AV, Fredeking TM, Ignatyev GM. Changes in immune parameters and their correction in human cases of tick-borne encephalitis. *Clin Exp Immunol*. 2003;131(1):148–154. doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02050.x
49. Palus M, Formanová P, Salát J, Žampachová E, Elsterová J, Růžek D. Analysis of serum levels of cytokines, chemokines, growth factors, and monoamine neurotransmitters in patients with tick-borne encephalitis: identification of novel inflammatory markers with implications for pathogenesis: serum Inflammatory Markers in TBE. *J Med Virol*. 2015;87(5):885–892. doi:10.1002/jmv.24140
50. Zidovec-Lepej S, Vilibic-Cavlek T, Ilic M, et al. Quantification of Antiviral Cytokines in Serum, Cerebrospinal Fluid and Urine of Patients with Tick-Borne Encephalitis in Croatia. *Vaccines*. 2022;10(11):1825. doi:10.3390/vaccines10111825

10. Streszczenie w języku polskim

Wirus kleszczowego zapalenia mózgu (TBEV), którego nazwa gatunkowa została w 2023 roku zmieniona na *Orthoflavivirus encephalitidis*, należy do rodziny *Flaviviridae* oraz rodzaju *Orthoflavivirus* (do niedawna *Flavivirus*), wywołuje zakażenia ośrodkowego układu nerwowego w Europie i Azji. Zakażenie może przebiegać łagodnie lub nawet bezobjawowo, ale niekiedy ma ciężki przebieg, prowadząc do trwałych powikłań neurologicznych. Niezależnie od ciężkości przebiegu, u części ozdrowieńców występuje pozapalny zespół postencefaliczny. Przyczyny tego zróżnicowanego przebiegu klinicznego choroby nie są w pełni poznane, co stanowi istotne wyzwanie dla współczesnej medycyny. Przypuszcza się, że zmienność kliniczna KZM jest związana z indywidualnymi różnicami w odpowiedzi układu odpornościowego. Obecnie nie dysponujemy skutecznym leczeniem przyczynowym, dlatego kluczowe jest zapobieganie zakażeniom poprzez szczepienia ochronne oraz unikanie ukłuć kleszczy.

Celem badań była ocena obecności przeciwciał przeciwko KZM w populacji północno-wschodniej Polski, by ocenić częstość występowania bezobjawowego zakażenia KZM. Analizowano także postawy wobec szczepionki przeciwko KZM, którą określono w anonimowej ankiecie wśród mieszkańców tego endemicznego regionu. Dodatkowo, celem pracy była analiza przydatności chitynazy-3-podobnej-1 (CHI3L1) w surowicy krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym jako biomarkera ciężkości przebiegu KZM w populacji pediatrycznej. W toku prowadzonych badań oceniono również związek CHI3L1 ze stężeniem cytokin zapalnych, integralnością bariery krew-mózg (BBB), odpowiedzią immunologiczną i ciężkością infekcji u dzieci i młodzieży.

Przeciwciała anty-KZM IgG wykryto u 14/298 (5%) dawców krwi oraz u 4/180 (2%) dzieci bez historii szczepień przeciwko KZM i bez wywiadu zachorowania na KZM. Na postawie badania ankietowego ustalono, że tylko 9% respondentów było zaszczepionych przeciwko KZM i taki sam odsetek zaszczepił swoje dziecko. Co trzeci nieszczepiony respondent wyraził chęć zaszczepienia siebie lub swojego dziecka w przyszłości. Zamiar ten był istotnie wyższy wśród ankietowanych niedawno ukłutych przez kleszcza oraz ankietowanych, których bliscy zachorowali na chorobę odkleszczową w przeszłości.

Stężenia CHI3L1 w płynie mózgowo-rdzeniowym i surowicy nie różniły się między dziećmi z zapaleniem mózgu a dziećmi z zapaleniem opon mózgowych wywołanymi przez wirus KZM. Po uwzględnieniu przepuszczalności BBB, indeks CHI3L1 był 2,4-krotnie niższy u pacjentów z zapaleniem mózgu, niż u tych z zapaleniem opon mózgowych. Po leczeniu zaobserwowano zmniejszenie stężeń CHI3L1, IL-6 i TNF-α w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz poprawę przepuszczalności BBB u młodszych dzieci. U starszych przepuszczalność BBB częściej pozostawała nieprawidłowa, niezależnie od ciężkości przebiegu. Analiza korelacji wykazała związki między stężeniami CHI3L1 a markerami prozapalnymi, zwłaszcza chemeryną, IL-6 i TNF-α, w obu grupach klinicznych.

Podsumowując, poziom wyszczepienia oraz chęć przyjęcia szczepionki przeciwko KZM w regionie endemicznym są alarmująco niskie. Zależność między akceptacją szczepień a osobistymi doświadczeniami związanymi z ukłuciami przez kleszcze sugeruje potrzebę prowadzenia kampanii edukacyjnych zwiększających świadomość zagrożeń związanych z kleszczami. Dane dotyczące analizy patofizjologii KZM sugerują, że CHI3L1 odgrywa istotną rolę w modulacji odpowiedzi zapalnych i immunologicznych podczas zakażenia, co czyni te białko obiecującym biomarkerem. Przedłużające się procesy patologiczne w obrębie BBB mogą natomiast się wiązać z powikłaniami KZM, częściej obserwowanymi wśród starszych pacjentów. Jest to szczególnie istotne, ponieważ wykazaliśmy, że niezdiagnozowany, łagodny lub bezobjawowy przebieg KZM jest częsty zarówno u dorosłych, jak i dzieci.

11. Streszczenie w języku angielskim

The tick-borne encephalitis virus (TBEV), whose species name was changed in 2023 to *Orthoflavivirus encephalitidis*, belongs to the *Flaviviridae* family and the *Orthoflavivirus* genus (formerly *Flavivirus*), is causing central nervous system infections in Europe and Asia. The infection may be mild or even asymptomatic, however sometimes it takes a severe course, leading to permanent neurological complications. A significant proportion of patients who recover from the illness develop post-encephalitic syndrome, regardless of the severity of the disease. The causes of the variable clinical course of the disease remain not fully understood, being a challenge for modern medicine. It is supposed that the clinical variability of TBE is associated with individual differences in the immune response. Having no effective antiviral treatment available, the key is to prevent infections through vaccinations and avoiding tick bites.

The aim of this study was to measure seroprevalence of TBE antibodies in northeastern Poland, to assess the extent of TBE virus infections. A questionnaire-based survey among respondents from this endemic was also conduced to test their attitudes toward the TBE

vaccine. Another aim of the study was to evaluate the usefulness of measuring chitinase-3-like protein 1 (CHI3L1) levels in serum and cerebrospinal fluid as a biomarker for the severity of TBE in the pediatric population. The study also examined the relationships between CHI3L1 and inflammatory cytokine levels, blood-brain barrier (BBB) integrity, immune response, and the severity of infection in children and adolescents.

Anti-TBE IgG antibodies were detected in 14 out of 298 (5%) blood donors and in 4 out of 180 (2%) children, who had neither been vaccinated against TBE nor diagnosed with the disease. Based on the survey results, only 9% of respondents were vaccinated against TBE, and a similar percentage had vaccinated their children. One-third of unvaccinated respondents said they would vaccinate themselves or their children in the future. Our study showed that this intention was significantly higher among respondents who had recently been bitten by a tick or had a close relative diagnosed with a tick-borne disease. Negative attitudes toward TBE vaccination were associated with the younger age of respondents.

Cerebrospinal fluid and serum levels of CHI3L1 in did not differ between children with encephalitis and children with meningitis caused by the TBE virus. After adjusting for BBB permeability, the CHI3L1 index was 2.4 times lower in patients with encephalitis than in those with meningitis. In younger children, post-treatment, a reduction in CHI3L1, IL-6, and TNF-α concentrations in cerebrospinal fluid was observed, along with improvement of BBB permeability. However, in older children, the albumin index remained abnormal in both severity groups. Correlation analysis revealed associations between CHI3L1 levels and pro-inflammatory markers, particularly chemerin, IL-6, and TNF-α, in both clinical groups.

In conclusion, the vaccination rate and willingness to uptake the TBE vaccine in this endemic region remains alarmingly low. There was a correlation between vaccine acceptance and personal experiences with tick bites, which emphasizes the need for educational campaigns raising awareness about the risks associated with ticks. The analysis of TBE pathophysiology showed that CHI3L1 plays an important role in modulating inflammatory and immune responses during infection, making this protein a promising biomarker. A prolonged pathological processes within the BBB were also found, what may be associated with complications of TBE, which are more frequently observed in older patients. This is particularly important because this study found that undiagnosed mild or asymptomatic TBE infections are common, both in adults and children.

12. Piśmiennictwo

1. Postler, T. S. et al. Renaming of the genus Flavivirus to Orthoflavivirus and extension of binomial species names within the family Flaviviridae. Arch. Virol. 168, 1–7 (2023).
2. YOSHII, K. Epidemiology and Pathological Mechanisms of Tick-Borne Encephalitis. J Vet Med Sci 2019, 81, 343–347.
3. Taba, P.; Schmutzhard, E.; Forsberg, P.; Lutsar, I.; Ljøstad, U.; Mygland, Å.; Levchenko, I.; Strle, F.; Steiner, I. EAN Consensus Review on Prevention, Diagnosis and Management of Tick-Borne Encephalitis. Eur J Neurol 2017, 24, 1214-e61.
4. National Institute of Public Health NIH – NRI, GIS. Vaccinations in Poland; 2000-2022. (dane z 08.12.2024) http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index_p.html
5. Moniuszko-Malinowska, A.; Dunaj, J.; Czupryna, P.; Król, M.; Grygorczuk, S.; Świerzbińska, R.; Pancewicz, S. Absence of Serological Evidence for WNV Presence in Symptomatic Patients in Poland. Infect Dis (Lond) 2019, 51, 782–784.
6. Popiel, M.; Perlejewski, K.; Bednarska, A.; Dzieciątkowski, T.; Paciorek, M.; Lipowski, D.; Jabłonowska, M.; Czeszko-Paprocka, H.; Bukowska-Ośko, I.; Caraballo Cortes, K.; et al. Viral Etiologies in Adult Patients with Encephalitis in Poland: A Prospective Single Center Study. PLoS ONE 2017, 12, e0178481.
7. Bogovic, P. Tick-Borne Encephalitis: A Review of Epidemiology, Clinical Characteristics, and Management. WJCC 2015, 3, 430.
8. 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. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1992, 11, 894–900,
9. Lotric-Furlan, S.; Avsic-Zupanc, T.; Strle, F. An Abortive Form of Tick-Borne Encephalitis (TBE)--a Rare Clinical Manifestation of Infection with TBE Virus. Wien. Klin. Wochenschr. 2002, 114, 627–629.
10. Panatto, D.; Domnich, A.; Amicizia, D.; Reggio, P.; Iantomasi, R. Vaccination against Tick-Borne Encephalitis (TBE) in Italy: Still a Long Way to Go. 2022, 17.
11. Cocchio, S.; Bertoncello, C.; Napoletano, G.; Claus, M.; Furlan, P.; Fonzo, M.; Gagliani, A.; Saia, M.; Russo, F.; Baldovin, T.; et al. Do We Know the True Burden of Tick-Borne Encephalitis? A Cross-Sectional Study. Neuroepidemiology 2020, 54, 227–234.

12. Šmit, R. Reviewing Estimates of the Burden in Disability-Adjusted Life Years (DALYs) of Tick-Borne Encephalitis in Slovenia. Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research 2019, 19, 299–303.
13. COMMISSION IMPLEMENTING DECISION (EU) 2018/ 945 - of 22 June 2018 - on the Communicable Diseases and Related Special Health Issues to Be Covered by Epidemiological Surveillance as Well as Relevant Case Definitions.
14. Růžek, D.; Salát, J.; Singh, S.K.; Kopecký, J. Breakdown of the Blood-Brain Barrier during Tick-Borne Encephalitis in Mice Is Not Dependent on CD8+ T-Cells. PLoS ONE 2011, 6, e20472.
15. Baldacci, F.; Lista, S.; Palermo, G.; Giorgi, F.S.; Vergallo, A.; Hampel, H. The Neuroinflammatory Biomarker YKL-40 for Neurodegenerative Diseases: Advances in Development. Expert Review of Proteomics 2019, 16, 593–600.
16. Bardina, S.V.; Lim, J.K. The Role of Chemokines in the Pathogenesis of Neurotropic Flaviviruses. Immunol Res 2012, 54, 121–132.
17. Zajkowska, J.; Moniuszko-Malinowska, A.; Pancewicz, S.; Muszyńska-Mazur, A.; Kondrusik, M.; Grygorczuk, S.; Świerzbińska-Pijanowska, R.; Dunaj, J.; Czupryna, P. Evaluation of CXCL10, CXCL11, CXCL12 and CXCL13 Chemokines in Serum and Cerebrospinal Fluid in Patients with Tick Borne Encephalitis (TBE). Advances in Medical Sciences 2011, 56, 311–317.
18. Guziejko, K.; Czupryna, P.; Pancewicz, S.; Świerzbińska, R.; Dunaj, J.; Kruszewska, E.; Król, M.E.; Zajkowska, J.; Grygorczuk, S.; Żebrowska, A.; et al. Analysis of CCL-4, CCL-17, CCL-20 and IL-8 Concentrations in the Serum of Patients with Tick-Borne Encephalitis and Anaplasmosis. Cytokine 2020, 125, 154852.

13. Informacje o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem procentowego wkładu każdego z nich oraz oświadczenia o zgodzie na wykorzystanie publikacji w rozprawie doktorskiej

„Tick-borne encephalitis - a review of current epidemiology, clinical symptoms, management and prevention” opublikowana w Przeglądzie Epidemiologicznym (2020)

Imię i nazwisko współautora	**Charakter udziału**	**Procentowy wkład**
doktorant- lek. Ewa Bojkiewicz	Zebranie piśmiennictwa, przygotowanie manuskryptu	55%
dr. hab. Kacper Toczyłowski	Ocena merytoryczna pracy	25%
prof. dr hab. Artur Sulik	Opracowanie koncepcji i projektu pracy, ocena merytoryczna pracy	20%

“The Prevalence of Asymptomatic Infections with Tick-Borne Encephalitis Virus and Attitude towards Tick-Borne Encephalitis Vaccine in the Endemic Area of Northeastern Poland” opublikowana w Vaccines (Basel) (2022)

Imię i nazwisko współautora	**Charakter udziału**	**Procentowy wkład**
doktorant- lek. Ewa Bojkiewicz	Zebranie piśmiennictwa, przygotowanie manuskryptu, gromadzenie ankiet	55%
dr. hab. Kacper Toczyłowski	Ocena merytoryczna pracy, analiza statystyczna	10%
dr hab. Sambor Grygorczuk	Opracowanie koncepcji pracy, pomoc w przygotowaniu manuskryptu i analizie statystycznej	5%
dr hab. Beata Żelazowska-Rutkowska	Przeprowadzenie i analiza badań serologicznych	5%
dr. hab. Justyna Dunaj-Małyszko	Przeprowadzenie i analiza badań serologicznych	5%

dr n. med. Agnieszka Żebrowska	Rekrutowanie pacjentów i nadzór nad pobieraniem i postępowaniem z próbkami	5%
dr hab. Piotr Czupryna	Opracowanie koncepcji pracy, pomoc w przygotowaniu manuskryptu	5%
prof. dr hab. Anna Moniuszko-Malinowska	Ocena merytoryczna pracy	5%
prof. dr hab. Artur Sulik	Ocena merytoryczna pracy	5%

"The Role of Chitinase 3-Like-1 (YKL-40) and Proinflammatory Biomarkers in the Pathogenesis of Pediatric Tick-Borne Encephalitis in a Polish Cohort" opublikowana w Journal of Inflammation Research (2024)

Imię i nazwisko współautora	**Charakter udziału**	**Procentowy wkład**
doktorant- lek. Ewa Bojkiewicz	Zebranie piśmiennictwa, przygotowanie manuskryptu, gromadzenie materiału badawczego	55%
dr. hab. Kacper Toczyłowski	Ocena merytoryczna pracy, analiza statystyczna	15%
lek. Dawid Lewandowski	Gromadzenie materiału badawczego	5%
dr. Diana Martonik	Przeprowadzenie i analiza badań laboratoryjnych	5%
prof. dr hab. Robert Flisiak	Ocena merytoryczna pracy	5%
prof. dr hab. Artur Sulik	Opracowanie koncepcji i projektu pracy, Ocena merytoryczna pracy	15%

Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacji:

„Tick-borne encephalitis - a review of current epidemiology, clinical symptoms, management and prevention"

Bojkiewicz Ewa, Toczyłowski Kacper Sulik Artur opublikowanej w Przeglądzie Epidemiologicznym (2020)

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału
kandydat - lek. Ewa Bojkiewicz	Analiza piśmiennictwa, napisanie pracy przeglądowej
dr hab. Kacper Toczyłowski	Ocena merytoryczna pracy
prof. dr hab. Artur Sulik	Opracowanie koncepcji i projektu pracy, ocena merytoryczna pracy

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Ewy Bojkiewicz.

Ewa Bojkiewicz
....
Podpis kandydata

Potwierdzam opisany powyżej merytoryczny wkład kandydata w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.

Art Sulik
....

Podpis promotora

Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacji:

„The Prevalence of Asymptomatic Infections with Tick-Borne Encephalitis Virus and Attitude towards Tick-Borne Encephalitis Vaccine in the Endemic Area of Northeastern Poland" Ewa Bojkiewicz, Kacper Toczyłowski, Sambor Grygorczuk, Beata Zelazowska-Rutkowska, Justyna Dunaj, Agnieszka Zebrowska, Piotr Czupryna, Anna Moniuszko-Malinowska i Artur Sulik opublikowanej w Vaccines (Basel) (2022)

Imię i nazwisko współautora	**Charakter udziału**
kandydat - lek. Ewa Bojkiewicz	Zebranie piśmiennictwa, przygotowanie manuskryptu, gromadzenie ankiet
dr hab.Kacper Toczyłowski	Ocena merytoryczna pracy, analiza statystyczna
dr hab. Sambor Grygorczuk	Opracowanie koncepcji pracy, pomoc w przygotowaniu manuskryptu i analizie statystycznej
dr hab. Justyna Dunaj - Małyszko	Przeprowadzenie i analiza badań serologicznych
dr hab. Beata Żelazowska – Rutkowska	Przeprowadzenie i analiza badań serologicznych
dr. Agnieszka Żebrowska	Rekrutowanie pacjentów i nadzór nad pobieraniem i postępowaniem z próbkami
dr hab. Piotr Czupryna	Opracowanie koncepcji pracy, pomoc w przygotowaniu manuskryptu
prof. dr hab. Anna Moniuszko - Malinowska	Opracowanie koncepcji pracy, pomoc w przygotowaniu manuskryptu
prof. dr hab. Artur Sulik	Ocena merytoryczna pracy

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Ewy Bojkiewicz.

Ewa Bojkiewicz
Podpis kandydata

Potwierdzam opisany powyżej merytoryczny wkład kandydata w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.

Art Sulik
Podpis promotora

Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacji:

„The Role of Chitinase 3-Like-1 (YKL-40) and Proinflammatory Biomarkers in the Pathogenesis of Pediatric Tick-Borne Encephalitis in a Polish Cohort"

Ewa Bojkiewicz, Kacper Toczyłowski, Dawid Lewandowski, Diana Martonik, Robert Flisiak i Artur Sulik opublikowany w Journal of Inflammation Research (2024)

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału
kandydat - lek. Ewa Bojkiewicz	Napisanie manuskryptu, analiza otrzymanych wyników
dr hab. Kacper Toczyłowski	pomoc przy planowaniu badania, współtworzenie manuskryptu, analiza otrzymanych wyników
lek. Dawid Lewandowski	Gromadzenie materiału badawczego
dr. Diana Martonik	Przeprowadzenie oznaczeń
prof. dr hab. Artur Sulik	Nadzór merytoryczny
prof. dr hab. Robert Flisiak	Nadzór merytoryczny

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Ewy Bojkiewicz.

........Ewa Bojkiewicz........

Podpis kandydata

Potwierdzam opisany powyżej merytoryczny wkład kandydata w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.

....

Podpis promotora

Dr hab. n. med. Kacper Toczyłowski
Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci
Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Białystok,14.01.2025

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„*Tick-borne encephalitis - a review of current epidemiology, clinical symptoms, management and prevention*" autorów Ewy Bojkiewicz i Artura Sulika, opublikowanej w Przeglądzie Epidemiologicznym, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. **„Ocena narażenia środowiskowego na zachorowanie na kleszczowe zapalenie mózgu w północno-wschodniej Polsce oraz analiza biomarkerów tej choroby u dzieci"** wynoszący 25% polegał na ocenie merytorycznej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewę Bojkiewicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

ADIUNKT
Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci UMB
dr hab. Kacper Toczyłowski

....

[Podpis]

Prof. dr hab. n. med. Artur Sulik
Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci
Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Białystok,14.01.2025

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„*Tick-borne encephalitis - a review of current epidemiology, clinical symptoms, management and prevention*" autorów Ewy Bojkiewicz i Kacpra Toczyłowskiego, opublikowanej w Przeglądzie Epidemiologicznym, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. **„Ocena narażenia środowiskowego na zachorowanie na kleszczowe zapalenie mózgu w północno-wschodniej Polsce oraz analiza biomarkerów tej choroby u dzieci"** wynoszący 20% polegał na opracowaniu koncepcji i projektu pracy oraz jej ocenie merytorycznej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewę Bojkiewicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Art. Sulik
....
[Podpis]

Dr hab. n. med. Kacper Toczyłowski
Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci
Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Białystok, 14.01.2025

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„*The Prevalence of Asymptomatic Infections with Tick-Borne Encephalitis Virus and Attitude towards Tick-Borne Encephalitis Vaccine in the Endemic Area of Northeastern Poland*” autorów Ewy Bojkiewicz, Sambora Grygorczuka, Beaty Zelazowskiej-Rutkowskiej, Justyny Dunaj, Agnieszki Żebrowskiej, Piotra Czupryny, Anny Moniuszko-Malinowskiej i Artura Sulika, opublikowanej w Vaccines, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. **„Ocena narażenia środowiskowego na zachorowanie na kleszczowe zapalenie mózgu w północno-wschodniej Polsce oraz analiza biomarkerów tej choroby u dzieci”** wynoszący 10% polegał na ocenie merytorycznej pracy oraz analizie statystycznej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewę Bojkiewicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

ADIUNKT
Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci UMB
Kacper Toczyłowski
dr hab. Kacper Toczyłowski

....
[Podpis]

Dr hab.n med.Justyna Dunaj -Małyszko
Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Białystok, 14.01.2025

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„*The Prevalence of Asymptomatic Infections with Tick-Borne Encephalitis Virus and Attitude towards Tick-Borne Encephalitis Vaccine in the Endemic Area of Northeastern Poland*" autorów Ewy Bojkiewicz, Kacpra Toczyłowskiego, Sambora Grygorczuka, Beaty Żelazowskiej-Rutkowskiej, Agnieszki Żebrowskiej, Piotra Czupryny, Anny Moniuszko-Malinowskiej, Artura Sulika opublikowanej w Vaccines, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. „**Ocena narażenia środowiskowego na zachorowanie na kleszczowe zapalenie mózgu w północno-wschodniej Polsce oraz analiza biomarkerów tej choroby u dzieci"** wynoszący 5% polegał na przeprowadzeniu i analizie badań serologicznych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewę Bojkiewicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Justyna Dunaj-Małyszko
[Podpis]

Dr hab. n. med., Piotr Czupryna
Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Białystok, 14.01.2025

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„*The Prevalence of Asymptomatic Infections with Tick-Borne Encephalitis Virus and Attitude towards Tick-Borne Encephalitis Vaccine in the Endemic Area of Northeastern Poland*" autorów Ewy Bojkiewicz, Kacpra Toczyłowskiego, Sambora Grygorczuka, Beaty Żelazowskiej-Rutkowskiej, Justyny Dunaj, Agnieszki Żebrowskiej, Anny Moniuszko-Malinowskiej, Artura Sulika opublikowanej w Vaccines, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. „**Ocena narażenia środowiskowego na zachorowanie na kleszczowe zapalenie mózgu w północno-wschodniej Polsce oraz analiza biomarkerów tej choroby u dzieci**" wynoszący 5 % polegał na opracowaniu koncepcji pracy oraz pomocy w przygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewę Bojkiewicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

dr hab. n. med. Piotr Czupryna
specjalista chorób wewnętrznych
specjalista chorób zakaźnych
2162639

Piotr Czupryna
....
[Podpis]

prof. dr hab. n. med. Anna Moniuszko-Malinowska
Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Białystok, 14.01.2025

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„*The Prevalence of Asymptomatic Infections with Tick-Borne Encephalitis Virus and Attitude towards Tick-Borne Encephalitis Vaccine in the Endemic Area of Northeastern Poland*" autorów Ewy Bojkiewicz, Kacpra Toczyłowskiego, Sambora Grygorczuka, Beaty Żelazowskiej-Rutkowskiej, Justyny Dunaj, Agnieszki Żebrowskiej, Piotra Czupryny, Artura Sulika opublikowanej w Vaccines, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. **„Ocena narażenia środowiskowego na zachorowanie na kleszczowe zapalenie mózgu w północno-wschodniej Polsce oraz analiza biomarkerów tej choroby u dzieci"** wynoszący 5 % polegał na ocenie merytorycznej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewę Bojkiewicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Prof. Anna Moniuszko-Malinowska
specjalista chorób wewnętrznych
specjalista chorób zakaźnych
medycyna morska i tropikalna
2162775
....

[Podpis]

Prof. dr. n. med. Artur Sulik
Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci
Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Białystok 14.01.2025

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„*The Prevalence of Asymptomatic Infections with Tick-Borne Encephalitis Virus and Attitude towards Tick-Borne Encephalitis Vaccine in the Endemic Area of Northeastern Poland*" autorów Ewy Bojkiewicz, Kacpra Toczyłowskiego, Sambora Grygorczuka, Beaty Zelazowskiej-Rutkowskiej, Justyny Dunaj, Agnieszki Żebrowskiej, Piotra Czupryny, Anny Moniuszko-Malinowskiej, opublikowanej w Vaccines, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. **„Ocena narażenia środowiskowego na zachorowanie na kleszczowe zapalenie mózgu w północno-wschodniej Polsce oraz analiza biomarkerów tej choroby u dzieci"** wynoszący 5% polegał na ocenie merytorycznej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewę Bojkiewicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Artur Sulik
....
[Podpis]

Dr hab. n. med. Sambor Grygorczuk
Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Białystok, 14.01.2025

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„*The Prevalence of Asymptomatic Infections with Tick-Borne Encephalitis Virus and Attitude towards Tick-Borne Encephalitis Vaccine in the Endemic Area of Northeastern Poland*" autorów Ewy Bojkiewicz, Kacpra Toczyłowskiego, Beaty Zelazowskiej-Rutkowskiej, Justyny Dunaj, Agnieszki Żebrowskiej, Piotra Czupryny, Anny Moniuszko-Malinowskiej, Artura Sulika opublikowanej w Vaccines, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. „**Ocena narażenia środowiskowego na zachorowanie na kleszczowe zapalenie mózgu w północno-wschodniej Polsce oraz analiza biomarkerów tej choroby u dzieci"** wynoszący 5% polegał na opracowaniu koncepcji pracy, pomocy w przygotowaniu manuskryptu i analizie statystycznej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewę Bojkiewicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Sambor Grygorczuk
....
[Podpis]

Dr hab. n. med. Beata Żelazowska-Rutkowska
Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej
Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Białystok,14.01.2025

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„*The Prevalence of Asymptomatic Infections with Tick-Borne Encephalitis Virus and Attitude towards Tick-Borne Encephalitis Vaccine in the Endemic Area of Northeastern Poland*" autorów Ewy Bojkiewicz, Kacpra Toczyłowskiego, Sambora Grygorczuka, Justyny Dunaj, Agnieszki Żebrowskiej, Piotra Czupryny, Anny Moniuszko-Malinowskiej, Artura Sulika opublikowanej w Vaccines, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. „**Ocena narażenia środowiskowego na zachorowanie na kleszczowe zapalenie mózgu w północno-wschodniej Polsce oraz analiza biomarkerów tej choroby u dzieci** wynoszący 5% polegał na przeprowadzeniu i analizie badań serologicznych

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewę Bojkiewicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Beata Żelazowska-Rutkowska
....
[Podpis]

dr n. med. Agnieszka Żebrowska
Regionalne Centrum Krwi i Krwiodawstwa
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 23
15-950 Białystok

Białystok, 15.01.2025

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„*The Prevalence of Asymptomatic Infections with Tick-Borne Encephalitis Virus and Attitude towards Tick-Borne Encephalitis Vaccine in the Endemic Area of Northeastern Poland*" autorów Ewy Bojkiewicz, Kacpra Toczyłowskiego, Sambora Grygorczuka, Beaty Żelazowskiej-Rutkowskiej, Justyny Dunaj, Piotra Czupryny, Anny Moniuszko-Malinowskiej, Artura Sulika opublikowanej w Vaccines, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. " **Ocena narażenia środowiskowego na zachorowanie na kleszczowe zapalenie mózgu w północno-wschodniej Polsce oraz analiza biomarkerów tej choroby u dzieci"** wynoszący 5% polegał na rekrutowaniu pacjentów i nadzór nad pobieraniem i postępowaniem z próbkami.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewę Bojkiewicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Agnieszka Żebrowska
[Podpis]

Prof. dr hab. n. med. Artur Sulik
Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci
Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Białystok,14.01.2025

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„*The Role of Chitinase 3-Like-1 (YKL-40) and Proinflammatory Biomarkers in the Pathogenesis of Pediatric Tick-Borne Encephalitis in a Polish Cohort*" autorów Ewy Bojkiewicz, Kacpra Toczyłowskiego, Dawida Lewandowskiego, Diany Martonik, Roberta Flisiaka, opublikowanej w Journal of Inflammation Research, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. „**Ocena narażenia środowiskowego na zachorowanie na kleszczowe zapalenie mózgu w północno-wschodniej Polsce oraz analiza biomarkerów tej choroby u dzieci**" wynosił 15% i polegał na opracowaniu koncepcji i projektu pracy oraz ocenie merytorycznej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewę Bojkiewicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Art Sulik
....
[Podpis]

Dr hab. n. med. Kacper Toczyłowski
Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci
Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Białystok, 14.01.2025

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„*The Role of Chitinase 3-Like-1 (YKL-40) and Proinflammatory Biomarkers in the Pathogenesis of Pediatric Tick-Borne Encephalitis in a Polish Cohort”* autorów Ewy Bojkiewicz, Dawida Lewandowskiego, Diany Martonik, Roberta Flisiaka i Artura Sulika, opublikowanej w Journal Of Inflammation Research, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. “ **Ocena narażenia środowiskowego na zachorowanie na kleszczowe zapalenie mózgu w północno-wschodniej Polsce oraz analiza biomarkerów tej choroby u dzieci**” wynosił 15% i polegał na ocenie merytorycznej pracy oraz wykonaniu analiz statystycznych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewę Bojkiewicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

ADIUNKT
Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci UMB
Kacper Toczyłowski
dr hab. Kacper Toczyłowski

…………………………...
[Podpis]

Lek. Dawid Lewandowski
Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci
Uniwersytecki Dziecięcy Szpital Kliniczny
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Białystok, 14.01.2025

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„*The Role of Chitinase 3-Like-1 (YKL-40) and Proinflammatory Biomarkers in the Pathogenesis of Pediatric Tick-Borne Encephalitis in a Polish Cohort t*" autorów Ewy Bojkiewicz, Kacpra Toczyłowskiego, Diany Martonik, Roberta Flisiaka i Artura Sulika, opublikowanej w Journal of Inflammation Research, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. „**Ocena narażenia środowiskowego na zachorowanie na kleszczowe zapalenie mózgu w północno-wschodniej Polsce oraz analiza biomarkerów tej choroby u dzieci", wynosił 5% i** polegał na gromadzeniu materiału badawczego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewę Bojkiewicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Dawid Lewandowski
....
[Podpis]

Dr n. med. Diana Martonik
Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Białystok, 14.01.2025

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„*The Role of Chitinase 3-Like-1 (YKL-40) and Proinflammatory Biomarkers in the Pathogenesis of Pediatric Tick-Borne Encephalitis in a Polish Cohort*" autorów Ewy Bojkiewicz, Kacpra Toczyłowskiego, Dawida Lewandowskiego, Roberta Flisiaka i Artura Sulka, opublikowanej w Journal of Inflammation Research, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. „**Ocena narażenia środowiskowego na zachorowanie na kleszczowe zapalenie mózgu w północno-wschodniej Polsce oraz analiza biomarkerów tej choroby u dzieci"** wynosił 5% i polegał na wykonaniu analiz laboratoryjnych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewę Bojkiewicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Diana Martonik
....
[Podpis]

Prof. dr hab. Robert Flisiak
Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Białystok, 14.01.2025

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„*The Role of Chitinase 3-Like-1 (YKL-40) and Proinflammatory Biomarkers in the Pathogenesis of Pediatric Tick-Borne Encephalitis in a Polish Cohort*" autorów Ewy Bojkiewicz, Kacpra Toczyłowskiego, Dawida Lewandowskiego, Diany Martonik i Artura Sulka, opublikowanej w PLOS Pathogens, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. **„Ocena narażenia środowiskowego na zachorowanie na kleszczowe zapalenie mózgu w północno-wschodniej Polsce oraz analiza biomarkerów tej choroby u dzieci**" wynosił 5% i polegał na ocenie merytorycznej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Ewę Bojkiewicz publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

....

[Podpis]

KOMISJA BIOETYCZNA
PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM W BIAŁYMSTOKU
ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok
tel. 85 748 54 07
komisjabioetyczna@umb.edu.pl

Białystok, 17.02.2022 r.

Uchwała nr: APK.002.104.2022

Na podstawie art. 29 ust. 2 i 14 ustawy dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz. U z 2020, poz. 514 ze zm.), Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Ocena narażenia środowiskowego na zachorowanie na kleszczowe zapalenie mózgu w rejonie endemicznym północno-wschodniej Polski i analiza czynników mogących wpływać na przebieg tej choroby u dzieci" przez dr hab. Artura Sulika wraz z zespołem badawczym z UMB.

Planowany okres realizacji od 17.02.2022 r. do XII.2022 r.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej przy UMB

prof. dr hab. Otylia Kowal-Bielecka

Pouczenie:
1. Odwołanie od uchwały komisji bioetycznej wyrażającej opinię może wnieść:
1) wnioskodawca;
2) kierownik podmiotu, w którym eksperyment medyczny ma być przeprowadzony;
3) komisja bioetyczna właściwa dla ośrodka, który ma uczestniczyć w wieloośrodkowym eksperymencie medycznym.
2. Odwołanie, o którym mowa w ust. 1, wnosi się za pośrednictwem komisji bioetycznej, która podjęła uchwałę, do Odwoławczej Komisji Bioetycznej w terminie 14 dni od dnia doręczenia uchwały wyrażającej opinię.

Potwierdzam, że Pani Ewa Bojkiewicz jest członkiem zespołu badawczego w w.w. projekcie badawczym.

Katarzyna Piuk

KOMISJA BIOETYCZNA
PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
w Białymstoku
ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok, tel. 85 748 54 07
e-mail: komisjabioetyczna@umb.edu.pl

KOMISJA BIOETYCZNA
PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM W BIAŁYMSTOKU

ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok
tel. 85 748 54 07
komisjabioetyczna@umb.edu.pl

Białystok, 19.12.2023 r.

Uchwała nr: APK.002.545.2023

Na podstawie art. 29 ust. 2 i 14 ustawy dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 1516 z późn. zm.), Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, po zapoznaniu się z wnioskiem o wyrażenie opinii o projekcie eksperymentu medycznego, **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie eksperymentu medycznego pt.: „Rola CHI3L1 w patogenezie kleszczowego zapalenia mózgu u dzieci" przez dr hab. Artura Sulika wraz z zespołem badawczym z UMB.

Eksperyment medyczny realizowany będzie w:
- Uniwersyteckim Dziecięcym Szpitalu Klinicznym w Białymstoku

Planowany okres realizacji od 19.12.2023 r. do XII.2024 r.

Uzasadnienie:
Na podstawie sporządzonego przez recenzenta projektu opinii o projekcie eksperymentu medycznego, Komisja Bioetyczna przy UMB stwierdza, że eksperyment medyczny spełnia warunki przeprowadzania eksperymentu i kryteria etyczne odnoszące się do prowadzenia eksperymentów z udziałem człowieka oraz celowości i wykonalności projektu.

W głosowaniu tajnym oddano:
- głosy za wydaniem opinii pozytywnej: 13
- głosy za wydaniem opinii negatywnej: 0

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej przy UMB

prof. dr hab. Otylia Kowal-Bielecka

Pouczenie:
1. Odwołanie od uchwały komisji bioetycznej wyrażającej opinię może wnieść:
1) wnioskodawca;
2) kierownik podmiotu, w którym eksperyment medyczny ma być przeprowadzony;
3) komisja bioetyczna właściwa dla ośrodka, który ma uczestniczyć w wieloośrodkowym eksperymencie medycznym.
2. Odwołanie, o którym mowa w ust. 1, wnosi się za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy UMB, do Odwoławczej Komisji Bioetycznej w terminie 14 dni od dnia doręczenia uchwały wyrażającej opinię.

Potwierdzam, że Pani Ewa Bojkiewicz jest członkiem zespołu badawczego w w/w. projekcie badawczym.

KOMISJA BIOETYCZNA
PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
w Białymstoku
ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok, tel. 85 748 54 07
e-mail: komisjabioetyczna@umb.edu.pl