

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

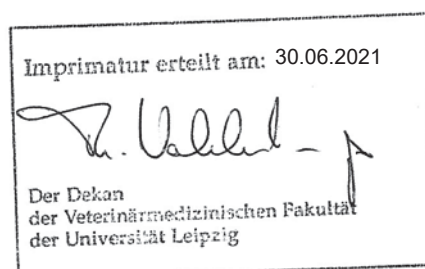
Der Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) als Wirt für subkutane Zecken und als Sentinel für das
Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus in Deutschland

Empfehle Erteilung der Druckgenehmigung; 29.06.2021 RC

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

eingereicht von
Maja Haut
aus Leverkusen

Leipzig, 2021



Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Martin Pfeffer

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

Prof. Dr. Stefanie Becker, Institut für Parasitologie, Stiftung Tierärztliche
Hochschule Hannover, Hannover

Tag der Verteidigung: 25.05.2021

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1 Der Rotfuchs (<i>Vulpes Vulpes</i>)	2
2.1.1 Taxonomie und Morphologie	2
2.1.2 Geografische Verbreitung	2
2.1.3 Populationsdichte und Reviergröße in Deutschland.....	3
2.1.4 Nahrungsauswahl des Rotfuchses	5
2.2 Zeckenfauna der Füchse	5
2.2.1 Taxonomie der Zecken	5
2.2.2 Lebenszyklus der Ixodidae	6
2.2.3 Zeckenarten bei Füchsen aus Deutschland.....	7
2.2.4 Phänomen subkutane Zecken	8
2.2.5 Zecken-übertragene Krankheitserreger beim Rotfuchs	9
2.3 Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) in Deutschland.....	11
2.3.1 Verbreitung in Deutschland.....	11
2.3.2 Übertragungszyklus des FSME-Virus	13
2.3.3 Veterinärmedizinische Diagnostik	14
2.3.4 Haus- und Wildtiere als Sentinel für das FSME-Virus	15
2.3.5 Der Rotfuchs als Sentinel für das FSME-Virus	16
3. Publikationen	18
3.1. Eigenanteil Publikation 1.....	18
3.1.1. Publikation 1.....	19
3.2. Eigenanteil Publikation 2.....	28
3.2.1. Publikation 2.....	28
4. Diskussion	42
5. Zusammenfassung.....	50
6. Summary	52
7. Referenzen.....	54
7.1 Literaturverzeichnis	54
7.2 Abbildungsverzeichnis	67
7.3 Tabellenverzeichnis	67
8. Danksagung.....	68

Abkürzungsverzeichnis

16S rRNA	16S ribosomale Ribonukleinsäure (S steht für Svedberg unit)
<i>A. americanum</i>	<i>Amblyomma americanum</i>
Abs.	Absatz
Arboviren	Arthropod-borne Virus (Arthropoden-übertragende Viren)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cox1	Cyclooxygenase-1
<i>D. marginatus</i>	<i>Dermacentor marginatus</i>
<i>D. reticulatus</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i>
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control (Europäisches Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten)
et al.	et alii (und andere)
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
FSME-Virus	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
<i>H. concinna</i>	<i>Haemaphysalis concinna</i>
<i>I. canisuga</i>	<i>Ixodes canisuga</i>
<i>I. crenulatus</i>	<i>Ixodes crenulatus</i>
<i>I. hexagonus</i>	<i>Ixodes hexagonus</i>
<i>I. kaiseri</i>	<i>Ixodes kaiseri</i>
<i>I. persulcatus</i>	<i>Ixodes persulcatus</i>
<i>I. ricinus</i>	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>I. trianguliceps</i>	<i>Ixodes trianguliceps</i>
IFA	Immunofluorescence assay
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IFT	Immunfluoreszenztest
km ²	Quadratkilometer
m	Meter
Nr.	Numero

Abkürzungsverzeichnis

NT	Neutralisationstest
o. g.	oben genannt(e)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
<i>R. sanguineus</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
S.	Satz
spp.	species pluralis
TBE	Tick-borne encephalitis
TBEV	Tick-borne encephalitis virus
vs.	versus
WILD	Wildtier-Informationssystem der Länder Deutschlands
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Der Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) ist unter den Wildtieren das am häufigsten vorkommende Raubtier Europas. Aufgrund seiner enormen Anpassungsfähigkeit, dem Fehlen von natürlichen Fressfeinden und dem omnivoren Fressverhalten, breitet sich der Fuchs zunehmend im menschlichen Siedlungsraum aus (JANKO et al. 2012). Der Rotfuchs fungiert sowohl durch seine Lebensweise als auch durch sein Fressverhalten als Wirt für eine Vielzahl von Ekto- und Endoparasiten (OTRANTO et al. 2015). Die Ektoparasiten, vor allem Flöhe, Zecken und Stechmücken, sind potentielle Vektoren für verschiedene bakterielle, virale und parasitäre Erreger. Bei einigen dieser Erreger handelt es sich um Zoonosen, die im Endwirt Mensch teilweise schwere Krankheitsbilder verursachen können.

Eine der wichtigsten von Zecken-übertragbaren Zoonose wird durch das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSME-Virus) ausgelöst. Das FSME-Virus zirkuliert zwischen kleinen Nagetieren als Reservoirwirte, domestizierten Haus- und Wildtieren als Endwirte und der Zecke als Vektor (PFEFFER et al. 2018). Der Hauptübertragungsweg ist der Zeckenstich. Obwohl Füchse regelmäßig mit Zecken befallen sind (MEYER-KAYSER et al. 2012), ihre Hauptnahrungsquelle potentiell infizierte Nagetiere sind (LUTZ 1978) und sie als Träger-Wirte infizierte Zecken in menschliches Habitat einbringen können (DOBLER et al. 2011), ist ihre Rolle im FSMEV-Übertragungszyklus bisher unklar.

Die Übertragung der Erreger von der Zecke auf den Wirt erfolgt über den Zeckenstich während der Blutmahlzeit (ŠIMO et al. 2017). Für die Dauer des Stichs ist die Zecke fest in der Haut des Wirtes verankert durch das mit Widerhaken versetzte Hypostom und das Ausbilden von Zement (DEPLAZES et al. 2016). Erstaunlicherweise findet man beim Rotfuchs Zecken, die normalerweise fest in der äußeren Haut verankert sind, im subkutanen Gewebe.

Die vorliegende Doktorarbeit hat daher das Ziel, eine systematische Erhebung dieses Phänomens bei Füchsen inklusive einer Speziesbestimmung der Zecken und der Charakterisierung pathohistologischer Abbauprozesse im subkutanen Gewebe durchzuführen. Zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit ist die serologische Untersuchung auf FSME-spezifische Antikörper beim Rotfuchs. Bislang existieren keine Studien, die die Sensitivität und Spezifität der verschiedenen serologischen Nachweismethoden beschreiben. Deswegen wurde der Seroprävalenzstudie ein Methodenvergleich von ELISA, IFT und NT vorangestellt. Die Ergebnisse der Serologie sollen die Rolle und Relevanz des Fuchses im Übertragungszyklus des FSME-Virus aufzeigen. Außerdem soll geprüft werden, ob der Rotfuchs als Sentinel für das Infektionsrisiko des Menschen für FSME geeignet ist.

2. Literaturübersicht

2.1 Der Rotfuchs (*Vulpes Vulpes*)

2.1.1 Taxonomie und Morphologie

Der Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) ist die einzige in Mitteleuropa vorkommende Fuchsart. Systematisch wird er in die Klasse der Säugetiere (Mammalia) eingeordnet und gehört zur Ordnung der Raubtiere (Carnivora). Innerhalb der Ordnung der Raubtiere wird der Rotfuchs zu der Familie der Hundeartigen (Canidae) und zur Gattung *Vulpes* gezählt. In der Gattung *Vulpes* wird insgesamt zwischen 10 Arten unterschieden, die häufigste und am weitesten verbreitete Art ist der Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) (LABHARDT 1990).

Der Rotfuchs besitzt als Wildcanide die kennzeichnenden Merkmale der Familie der Canidae: Einen stark verlängerten Gesichtsschädel, große und sehr bewegliche, stehende Ohrmuscheln, ein vielfältig einsetzbares Allesfressergebiss, einen langen, buschigen Schwanz, einen schlanken, wendigen Körperbau und relativ stumpfe, unbewegliche Krallen (LABHARDT 1990).

2.1.2 Geografische Verbreitung

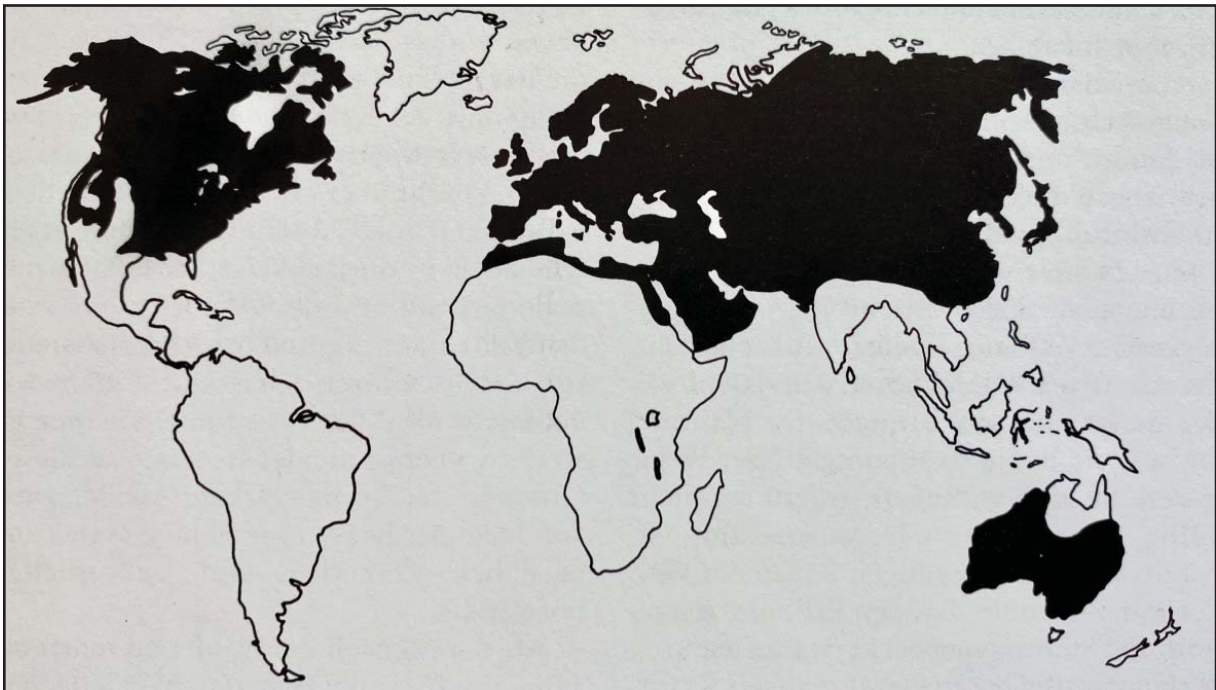


Abb. 1 Geografische Verbreitung des Rotfuchses nach LABHARDT 1990

Der Lebensraum des Rotfuchses erstreckt sich über die gesamte nördliche Hemisphäre: Im Norden bis an die polare Grenze, im Süden bis Nordafrika und dem Australischen Kontinent.

Damit besitzt er die größte geografische Reichweite aller Mitglieder der Ordnung Carnivora (MACDONALD 1993; LABHARDT 1990; HAUER et al. 2009). Nicht zu finden ist der Rotfuchs in Island, den arktischen Inseln, einigen Teilen Sibiriens oder in extremen Wüsten. Im 17. Jahrhundert wurde der Rotfuchs in die Vereinigten Staaten und nach Kanada eingeschleppt. Eine weitere Einführung erfolgte im 19. Jahrhundert nach Australien, wo er sich durch das Fehlen von Fressfeinden und ein reiches Nahrungsangebot rasant ausbreitete (ADKINS et al. 1998).

Seine enorme Anpassungsfähigkeit ermöglicht dem Rotfuchs die Verbreitung in Küsten-, Steppen- und Wüstenregionen, Gebirgen bis zu 4000 m, Wald- und Parklandschaften, offene Kulturlandschaften und dicht besiedelte menschliche Lebensräume (MACDONALD 1993). Besonders ist hieran, dass sich der Fuchs trotz seiner weiten globalen Ausbreitung, lokal standorttreu verhält und sich in relativ kleinräumigen Revieren fortbewegt (MACDONALD 1993).

2.1.3 Populationsdichte und Reviergröße in Deutschland

Der Rotfuchs stellt keine besonderen Anforderungen an seinen Lebensraum und besiedelt bevorzugt strukturreiche Landschaften, in denen sich Wald, Wiesen und offene Kulturlandschaften abwechseln.

In regelmäßigen Abständen werden über das Monitoring-Programm WILD (Wildtier-Informationssystem der Länder Deutschlands) Wildbestände in Deutschland über die Jägerschaft abgefragt. In Bezug auf den Rotfuchs werden dabei die Sichtungen von Altfüchsen und die Anzahl der Fuchswürfe pro Jagdrevier ermittelt. Bei der flächendeckenden Erfassung des Rotfuchses im Jahr 2015 wurden in 98 % der beteiligten Jagdbezirke Rotfüchse gesichtet mit einer mittleren Wurfbaudichte von 0,9 Würfen /1 km² Jagdbezirksfläche (ARNOLD et al. 2016). Daraus erfolgt die Berechnung des Frühjahrsbesatzes (Altfüchse/km²) und der Jungtierdichte nach der Methode von STUBBE (1988). Dementsprechend beläuft sich der Besatz im Frühjahr 2015 auf 2,1 Altfüchse pro 1 km² und 3,9 Welpen pro 1 km² Jagdbezirksfläche (ARNOLD et al. 2016). Die Anzahl der Welpen pro km² ist um durchschnittlich 25 % im Vergleich zu 2013 gestiegen und bedeutet einen enormen jährlichen Zuwachs der Fuchspopulation (ARNOLD et al. 2016).

Mit der gleichen Methodik haben JANKO et al. (2013) die Populationsdichte in einem Stadt-Land-Gradienten ermittelt. Denn durch den Lebensraumschwund in der offenen Kulturlandschaft werden immer höhere Fuchs-Populationsdichten in Städten beobachtet (JANKO et al. 2012). Die Populationsdichte der Füchse nimmt von Offenlandschaften (1,0

Altfüchse/km²), über Dörfer und Kleinstädte (2,5 Altfüchse/km²) bis hin zur Großstadt (15,7 Altfüchse/km²) kontinuierlich zu. Entsprechend ergibt sich eine direkte Korrelation zwischen der Urbanisierung des Lebensraumes und der Fuchsdichte. (JANKO et al. 2013).

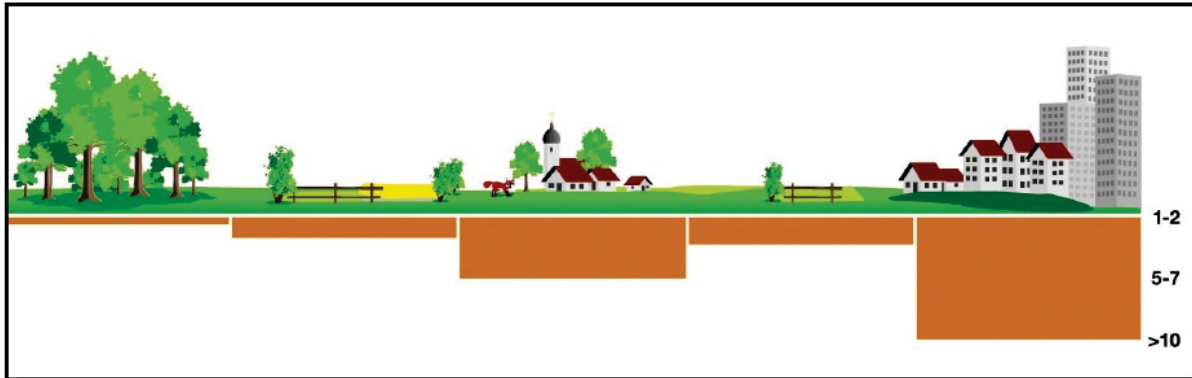


Abb. 2 Schematische Darstellung der Fuchs-Populationsdichten (Füchse pro km²) im Stadt-Land Gradienten (JANKO et al. 2013)

Die zunehmende Ausbreitung des Fuchses in den Städten resultiert daraus, dass die Schlüsselressourcen (1) ausreichendes Nahrungsangebot, (2) Deckung bei Tag und (3) Möglichkeit für das Anlegen von Wurfbaue in städtischen Habitaten, allesamt erfüllt sind (JANKO et al. 2013). Mit hoher Wahrscheinlichkeit gibt es aktuell in Mitteleuropa bis auf die Stadtkerne einiger Großstädte keine fuchsfreien Besiedlungsräume mehr (GORETZKI et al. 1982).

Als Revier oder Homerange wird das Gebiet bezeichnet, welches das Tier bei seinen physiologischen Aktivitäten wie Nahrungssuche, Fortpflanzung und Aufzucht der Jungen durchstreift (BURT 1943). Die Größe des Reviers von Rotfüchsen ist ebenso wie die Ausbreitung abhängig von den drei Schlüsselressourcen (JANKO et al. 2013). Wenn diese Schlüsselressourcen auf engstem Raum erfüllt werden, wird das Revier dementsprechend klein angelegt und umgekehrt. Dadurch ergeben sich variable Reviergrößen je nach Struktur des Lebensraums. Das größte Revier haben ländlich lebende Füchse mit mehr als 2 km² (CAVALLINI et al. 1994; REYNOLDS et al. 1995; DEKKER et al. 2001; WALTON et al. 2017). Urbane Füchse bewegen sich in einer Reviergröße von 0,1 km² bis 0,63 km² (ADKINS et al. 1998; WHITE et al. 2006; MARKS et al. 2006).

Insgesamt bewegt sich der Fuchs sowohl in städtischen als auch in ländlichen Habitaten in relativ kleinräumigen Revieren fort. Das hat den Vorteil, dass bei einer postmortalen Untersuchung auf Vektoren oder Vektor-übertragene Pathogene der Erlegungsort des Fuchses mit dem Infektionsort gleichgesetzt werden kann.

2.1.4 Nahrungsauswahl des Rotfuchses

Der Rotfuchs ist ein anspruchsloser Allesfresser, wenngleich tierische Nahrung in Form von frischem Fleisch bevorzugt wird (MACDONALD 1993). Die Nahrungsauswahl variiert lokal und saisonal und umfasst folgende Komponenten: Nahrungsabfälle, Regenwürmer, kleine Nagetiere, Vögel, Kaninchen, Insekten, Obst und Früchte (MACDONALD 1993). Die Nahrung wird je nach Verfügbarkeit der Ressourcen ausgewählt, sodass der Fuchs als Omnivore fehlende Fleischnahrung durch beispielsweise Nahrungsabfälle, Insekten oder Obst ersetzen kann (LUTZ 1978). Entscheidend für die Futtersuche des Rotfuchses ist neben der Futterverfügbarkeit, welche Nahrung in kürzester Zeit und mit geringstem Energieaufwand erbeutet werden kann (MACDONALD 1977; LABHARDT 1990).

Die omnivore Ernährung und die ökonomische Futtersuche führen zu einer geringen Hungersterblichkeit, einer weiten Verbreitung und einem geringen Raumanspruch (LABHARDT 1990). In Verbindung mit der hohen Anpassungsfähigkeit und der Abwesenheit von natürlichen Fressfeinden, bieten sich dem Fuchs optimale Bedingungen für das Erschließen verschiedenster Habitate (LABHARDT 1990; JANKO et al. 2013).

Bevorzugte Nahrung und Beutefavorit des Fuchses sind kleine Nagetiere (LUTZ 1978). Diese sind besonders attraktive Beutetiere, da ihre Körpergröße und ihr Nährwert in einem positiven Verhältnis zu dem Energieaufwand während der Jagd stehen (LABHARDT 1990). Außerdem sind sie zahlreich und flächendeckend in Deutschland vorhanden (HAUER et al. 2009). In der Literatur als Beutetiere beschrieben sind Feldmäuse (*Microtus arvalis*), Erdmäuse (*Microtus agrestis*), Rötelmäuse (*Clethrionomys glareolus*), Schermäuse (*Arvicola terrestris*) und kleinäugige Wühlmäuse (*Pitymys subterraneus*) (MACDONALD 1977; LUTZ 1978).

2.2 Zeckenfauna der Füchse

2.2.1 Taxonomie der Zecken

Zecken gehören zu den häufigsten obligat blutsaugenden Ektoparasiten von Säugetieren, Vögeln und Reptilien. In der Human- und Veterinärmedizin haben Zecken größte Bedeutung als Vektoren von bakteriellen, viralen und parasitären Zoonosen (DEPLAZES et al. 2016).

Systematisch werden Zecken zu dem Stamm der Gliedertiere (Arthropoda), in die Klasse der Spinnentiere (Arachnida) und in die Unterklasse der Milben (Acari) eingeordnet. Innerhalb der Ordnung Metastigmata, der ca. 900 Arten angehören, werden drei Familien unterschieden: Ixodidae (Schildzecke), Argasida (Lederzecke) und Nuttalliellidae (MARQUARDT et al. 2005).

Zecken, die typischerweise auf Füchsen zu finden sind, gehören zu der Familie Ixodidae. In Europa parasitieren mehrere Zeckenspezies der Gattung *Ixodes*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma* und *Rhipicephalus* auf der Haut von Rotfüchsen (KARBOWIAK et al. 2020; LORUSSO et al. 2011; SÁNDOR et al. 2017; SOBRINO et al. 2012).

Da ausschließlich Zecken der Familie Ixodidae auf dem Rotfuchs parasitieren, werden im Folgenden lediglich die Eigenschaften dieser Familie charakterisiert.

2.2.2 Lebenszyklus der Ixodidae

Zecken der Familie Ixodidae durchlaufen einen vierstufigen Entwicklungszyklus – Ei, Larve, Nymphe und Adulte. Nach dem Schlupf aus dem Ei, benötigt jedes der drei postembryonalen Entwicklungsstadien eine Blutmahlzeit für das Erreichen des nächsten Stadiums oder für die Eiablage (Weibchen) (OLIVER 1989).

Während des mehrjährigen Entwicklungszyklus parasitieren Zecken nur temporär wenige Tage bis über eine Woche auf dem Wirt für die Nahrungsaufnahme. Die freilebenden Phasen verbringen die Zecken entweder in der offenen Vegetation (exophil) oder in Nestern und Tierbauten (endophil).

Die Wirtsuche ist abhängig von der Lebensweise der Zecken. Exophile Zecken (z. B. *I. ricinus*) suchen beispielsweise in der Vegetation ihren Wirt (SOBRINO et al. 2012). Dabei bevorzugen die verschiedenen Entwicklungsstadien unterschiedliche Wirte. Die Larven parasitieren hauptsächlich auf Kleinsäugetern und Vögeln. Nymphen bevorzugen mittelgroße Säugetiere wie beispielsweise Kaninchen, Igel oder Eichhörnchen. Adulte Stadien saugen auf Wildschweinen, Rehen oder Füchsen. Die Männchen dieser Zeckenspezies sind vor allem für die Paarung mit einem Weibchen auf dem Wirtstier zu finden und saugen nur fakultativ Blut.

Dagegen sind endophile Zecken (z. B. *I. hexagonus*, *I. canisuga*) hoch spezialisiert auf einen Wirt und leben in den Nestern oder Bauten ihrer bevorzugten Wirte. Alle drei Entwicklungsstufen parasitieren auf dem gleichen Wirtstier und die Kopulation findet außerhalb des Wirtes statt. Aus diesem Grund sind die Männchen dieser Zecken nur sehr selten auf dem Wirtstier zu finden (PFÄFFLE et al. 2011; WALKER 2018).

Nachdem ein passender Wirt gefunden ist, sucht die Zecke mit Hilfe von Sensillen, die an den Chelizeren sitzen, eine geeignete Hautpartie für die Blutaufnahme. Bei Sensillen handelt es sich um Sinnesorgane der Zecke, die an der Wahrnehmung von Temperatur und Vibrationen der Wirtshaut beteiligt sind (DEPLAZES et al. 2016). Bevorzugt werden wenig behaarte und dünnhäutige Körperstellen wie beispielsweise Kopf, Achselhöhlen, Inguinal- und Perianalregion (ESCCAP 2018).

Während des Zeckenstichs wird die Haut des Wirtes initial mit den Chelizeren angeritzt und anschließend wird das mit Widerhaken besetzte Hypostom in der entstandenen Wunde verankert. Mit dem Stich gibt die Zecke ihren Speichel in die Wunde ab. Dieser Speichel enthält ein als Zement bezeichnetes Sekret, das die Mundwerkzeuge der Zecke fest in der Wunde fixiert. Außerdem enthält der Speichel Substanzen, die die Blutgerinnung sowie Entzündungs- und Immunreaktion des Wirtes hemmen (SUPPAN et al. 2018).

Im Zuge des Zeckenstichs graben sich die verschiedenen Zeckenspezies unterschiedlich tief in die Haut ein. Anhand der Anatomie ihrer Mundwerkzeuge werden sie in zwei Kategorien eingeteilt. Zecken mit kurzen Mundwerkzeugen werden als Brevirostra (z. B. *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus*) bezeichnet und penetrieren nur die oberflächlichen Schichten der Epidermis. Kennzeichnend für Longirostra (z. B. *Amblyomma*, *Hyalomma*, *Ixodes*) sind lange Mundwerkzeuge, die bis in tiefe Schichten der Dermis eindringen können (KLOMPEN 2005; SLOVÁK et al. 2014)

Die Dauer des Saugaktes kann bei Larven 2-4 Tage, bei Nymphen 3-5 Tage und bei Weibchen 7-10 Tage andauern (GERN 2009). Männliche *Ixodes*-Zecken saugen nur fakultativ Blut und nehmen mehrere kleine Blutmahlzeiten zu sich (OLIVER 1989). Nach Vollendung der Blutmahlzeit löst sich die Zecke von der Wirtshaut und lässt sich gezielt in zum Beispiel Laub fallen (KHEÏSIN et al. 1956). Auf dem Boden häutet sie sich zu dem nächsten Entwicklungsstadium bzw. das Weibchen legt die Eier. Während *I. ricinus* Weibchen zwischen 1000-2500 Eier legen, kann das Eigelege von *D. reticulatus* über 5000 Eier umfassen (OLIVER 1989).

2.2.3 Zeckenarten bei Füchsen aus Deutschland

Der Rotfuchs beherbergt zahlreiche Endo- und Ektoparasitenarten. Die Ektoparasitenfauna des Fuchses wird dominiert durch Flöhe und Zecken, die als Vektoren verschiedene infektiöse Erreger auf den Fuchs übertragen können (Abschnitt 2.2.5). Derzeit existieren nur wenige Arbeiten zu der Zeckeninfestation des Fuchses in Deutschland, die allerdings durchweg hohe Prävalenzen von 73 % - 76,9 % beschreiben (SCHÖFFEL et al. 1991; MEYER-KAYSER et al. 2012). In einer Vergleichsstudie wurde festgestellt, dass bei Füchsen mit manifester Räude eine erhöhte Befallsintensität (82,6 % vs. 76,9 %) zu verzeichnen ist. Zudem ist die durchschnittliche Anzahl an Zecken (ø33,4 Zecken/Tier vs. ø11,7 Zecken/Tier) im Vergleich zu klinisch unauffälligen Tieren erhöht (MEYER-KAYSER et al. 2011).

Am häufigsten lässt sich *I. ricinus* auf der Haut von Füchsen nachweisen, gefolgt von *I. hexagonus* und *I. canisuga* (CORNELLY et al. 1992; HEIDRICH 2000; LIEBISCH et al. 1986;

SCHÖFFEL et al. 1991; MEYER-KAYSER et al. 2012). Deutlich seltener werden auch *D. reticulatus*, *I. kaiseri* und *H. concinna* gefunden (LIEBISCH et al. 1997; MEYER-KAYSER et al. 2012; HORNOK et al. 2017).

Die Wirtspräferenz der einzelnen *I. ricinus* Stadien spiegelt sich in der Zeckenfauna des Fuchses wider. Es parasitieren hauptsächlich Nymphen und Adulte *I. ricinus* Zecken auf dem Fuchs (CORNELY et al. 1992; MEYER-KAYSER et al. 2012). Aufgrund der oben genannten endophilen Lebensweise von *I. canisuga* parasitieren alle drei Entwicklungsstadien dieser Zeckenspezies ganzjährig auf dem Rotfuchs. Auch die endophile Igelzecke *I. hexagonus* wird häufig in Fuchsbauten und auf den Füchsen selbst gefunden (LIEBISCH et al. 1986; CORNELY et al. 1992; MEYER-KAYSER et al. 2012).

Hinsichtlich des Geschlechts der Zecken, die auf dem Rotfuchs gefunden werden, sind deutliche Unterschiede erkennbar. Diese Unterschiede beruhen ebenfalls auf den unterschiedlichen Lebensweisen der Zecken. Männliche *I. hexagonus* und *I. canisuga* werden nur sehr selten auf dem Fuchs gefunden, da die Paarung dieser Zeckenarten außerhalb des Wirtes im Bau oder im Nest stattfindet. Dagegen werden regelmäßig die Männchen von *I. ricinus* und *D. reticulatus* von dem Rotfuchs abgesammelt, da die Männchen das Weibchen während des Saugaktes auf dem Wirt begatten (CORNELY et al. 1992; MEYER-KAYSER et al. 2012).

2.2.4 Phänomen subkutane Zecken

Zecken sind wie o. g. typische Ektoparasiten, welche in komplexer Weise mit ihrem Wirt interagieren. Während des Stichs sind sie durch die Widerhaken am Hypostom und durch das Ausbilden von Zement fest in der äußeren Haut des Wirtes verankert. Erstaunlicherweise ist jedoch bereits in mehreren Arbeiten eine subkutane Lokalisation von Zecken beschrieben worden.

Dieses Phänomen konnte erstmals beim Rotfuchs 1914 von NUTTAL (1914) in Großbritannien beobachtet werden. Danach folgten weitere Berichte und Nachweise aus Polen (DROZDZ 1958), Österreich (HINIDAY 1971; HINAIDY 1976), der Slowakei (LEBEDA 1962; PET'KO et al. 1991) und den Vereinigten Staaten von Amerika (SMITH et al. 1986). Bei diesen Studien handelt es sich um Einzelfallberichte, bei denen die Füchse oft im Rahmen anderer Fragestellungen untersucht wurden. Die Präsenz der Zecken im subkutanen Gewebe wird berichtet, ohne Daten über die Prävalenz und Häufigkeit der Zecken sowie mögliche pathophysiologische Mechanismen ermittelt zu haben.

Die erste systematische Arbeit zu dieser Thematik stammt von D'AMICO et al. (2017). Diese Arbeitsgruppe untersuchte in Tschechien und Rumänien 91 Füchse gezielt auf das Vorkommen von subkutanen Zecken. Es konnte gezeigt werden, dass insgesamt 14 der 91 Füchse (15,4 %) mit mindestens einer bis maximal 31 subkutanen Zecken infestiert waren. Insgesamt 9 dieser Zecken konnten morphologisch den Spezies *I. ricinus*, *I. hexagonus*, *I. crenulatus* und *D. reticulatus* zugeordnet werden, jedoch war die Bestimmung der restlichen Zecken aufgrund der fortgeschrittenen Zersetzung nicht möglich. Da nur sehr wenige Zecken bis auf Spezieslevel identifiziert werden konnten, lässt sich keine Aussage über die Häufigkeit der einzelnen Zeckenarten im subkutanen Gewebe treffen. Histologische Untersuchungen der Hautareale mit subkutanen Zecken ergaben eine granulomatöse Panniculitis. Es wurden lediglich Zecken im fortgeschrittenen Zersetzungsstadium histologisch untersucht, sodass der Zersetzungsprozess der Zecke nicht gezeigt werden konnte. DWUŻNIK (2019) untersuchte zuletzt Füchse in Polen und ermittelte im Vergleich zur Arbeit von D'AMICO et al. (2017) eine höhere Prävalenz von insgesamt 38 %.

Im Jahr 2018 wurden erstmals subkutane Zecken bei Marderhunden (*Nyctereutes procyonoides*) aus Polen beschrieben (MATYSIAK et al. 2018). Zwei der drei untersuchten Marderhunden waren jeweils mit einem *I. ricinus* Weibchen im subkutanen Gewebe infestiert. Zusätzlich zu den o. g. Wildtieren wurde das Phänomen subkutaner Zecken auch als Zufallsbefund bei einem Hund in Schweden (ZAKRISSON 2010) und einem Kind in Südkorea (CHANG et al. 2006) beobachtet.

2.2.5 Zecken-übertragene Krankheitserreger beim Rotfuchs

Zecken und Wildtiere sind Hauptreservoir für eine Vielzahl von Zecken-übertragene Krankheitserregern (engl.: tick-borne diseases), die während des Zeckenstichs auf den Wirtsorganismus übertragen werden. Bei den übertragenen Pathogenen handelt es sich um Viren, Bakterien, Protozoen sowie Helminthen, die im Endwirt teilweise schwere Krankheitsbilder verursachen. Viele dieser Erreger haben zoonotisches Potential und breiten sich zunehmend aus, sodass sie in den Fokus von medizinischer und veterinärmedizinischer Forschung gerückt sind. Der Rotfuchs fungiert durch seine hohe Zeckenexposition als Reservoir- bzw. Zwischenwirt und ist dadurch an der Verbreitung und Übertragung dieser Pathogene beteiligt. Tabelle 1 zeigt die bekannten Zecken-übertragenen Krankheitserreger des Rotfuchses in Europa.

Tab. 1 Zecken-übertragene Pathogene des Rotfuchses in Europa

Pathogen	Vektor (Zeckenspezies)	Referenz
Virus		
Frühsommer-Meningoenzephalitis Virus	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	(WURM et al. 2000)
Bakterien		
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>I. ricinus</i>	(EBANI et al. 2011)
<i>Anaplasma platys</i>	<i>R. sanguineus</i>	(CARDOSO et al. 2015)
<i>Bartonella</i> spp.	Arthropoden, <i>I. ricinus</i>	(GERRIKAGOITIA et al. 2012)
<i>Borrelia burgdorferi</i> -Komplex	<i>I. ricinus</i> , <i>I. hexagonus</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>D. reticulatus</i>	(LLEDÓ et al. 2016)
<i>Coxiella burnetti</i>	<i>Ixodes</i> spp. <i>Dermacentor</i> spp.	(SANTORO et al. 2016)
<i>Ehrlichia canis</i>	<i>R. sanguineus</i>	(CARDOSO et al. 2015)
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	<i>A. americanum</i>	(GROEN et al. 2002)
<i>Rickettsia conorii</i>	<i>R. sanguineus</i>	(ORTUÑO et al. 2018)
<i>Rickettsia slovaca</i>	<i>D. reticulatus</i> , <i>D. marginatus</i>	(LLEDÓ et al. 2016)
Protozoen		
<i>Babesia vulpes</i>	<i>I. hexagonus</i>	(NAJM et al. 2014)
<i>Babesia venatorum</i>	<i>I. ricinus</i>	(NAJM et al. 2014)
<i>Babesia microti</i> -Komplex	<i>I. ricinus</i> , <i>I. trianguliceps</i>	(NAJM et al. 2014)
<i>Hepatozoon canis</i>	<i>R. sanguineus</i>	(DEŽDEK et al. 2010)
Helminthen		
<i>Acanthocheilonema reconditum</i>	Culicidae, <i>R. sanguineus</i>	(MAGI et al. 2008)
<i>Acanthocheilonema dracunculoides</i>	Culicidae, <i>R. sanguineus</i>	(MAGI et al. 2008)

In dieser Arbeit wird ein besonderer Fokus auf das Frühsommer-Meningoenzephalitis Virus gelegt. Dieses Virus kann beim Menschen eine Meningoenzephalitis verursachen und wird mit zunehmender Fallzahl vom Robert-Koch Institut dokumentiert (Robert Koch-Institut 2020a). Der aktuelle Forschungsstand wird im folgenden Kapitel dargelegt.

2.3 Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) in Deutschland

2.3.1 Verbreitung in Deutschland

Die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) gehört zu den wichtigsten von Zecken übertragenen Zoonosen und zeigt einen teilweise schweren bis lebensbedrohlichen Krankheitsverlauf. Ausgelöst wird FSME durch das FSME-Virus.

Das FSME-Virus wird aufgrund seiner Struktur und seinem Aufbau der Gattung Flavivirus innerhalb der Familie der Flaviviridae zugeordnet (ECKER et al. 1999). Die Verbreitung und Übertragung der Flaviviren erfolgt typischerweise über blutsaugende Arthropoden, weshalb sie als Arboviren (Arthropod-borne Virus) bezeichnet werden. Mögliche Vektoren sind Stechmücken und Zecken, allerdings gibt es auch wenige Flaviviren, bei denen kein Vektor bekannt ist. Zu den von Zecken übertragenen Flaviviren gehören unter anderem das Omsk-Hämorrhagische-Fieber-Virus, das Powassan-Virus, das Louping-ill-Virus sowie das FSME-Virus (LINDQVIST et al. 2018).

Das FSME-Virus ist in weiten Teilen Europas und Asiens endemisch und wird in mindestens 3 bestätigten Subtypen unterteilt, den Fernöstlichen, den Sibirischen und den Europäischen Subtyp (ECKER et al. 1999). Zusätzlich zu den 3 genannten Subtypen wurden ein Baikal-Subtyp und ein Himalaya-Subtyp beschrieben (KOVALEV et al. 2017; DAI et al. 2018).

Die drei genetisch bestätigten FSME-Virus-Subtypen verursachen ähnliche Krankheitsbilder, die sich jedoch in Schwere der Erkrankung und der Letalität unterscheiden (CHARREL et al. 2004; GRITSUN et al. 2003; GÜNTHER et al. 2005). Die schwerste Form mit der höchsten Letalität (15-20 %) wird ausgelöst durch die Infektion mit dem Fernöstlichen Subtyp. Diese kann zu einer schweren fieberhaften Erkrankung assoziiert mit einer Enzephalitis führen (LINDQUIST et al. 2008; GRITSUN et al. 2003; ECKER et al. 1999). Im Gegensatz dazu verursacht der Sibirische Subtyp weniger schwere Erkrankungen (Letalität bis 5 %), die sich jedoch chronisch manifestieren können (LINDQUIST et al. 2008; GRITSUN et al. 2003). Der Europäische Subtyp ist vorherrschend in Europa und Infektionen mit diesem Subtyp verlaufen typischerweise biphasisch (BESTEHORN et al. 2019). Nach einer Inkubationszeit von 7-10 Tagen treten in der ersten Phase Fieber, Unwohlsein, Kopf- und Gliederschmerzen auf. Diese unspezifischen Symptome dauern 2 bis 4 Tage, gefolgt von einem symptomfreien Intervall von bis zu einer Woche. Die zweite Phase wird bei 15-30 % der Patienten ausgeprägt und ist gekennzeichnet durch eine spezifische neurologische Manifestation (Myelitis, Meningitis, Enzephalitis). Die Letalität bei erwachsenen Patienten ist vergleichbar mit dem Sibirischen Subtyp, liegt jedoch normalerweise unter 2 % (ECKER et al. 1999; GRITSUN et al. 2003).

In Deutschland zählen FSME-Erkrankungen des Menschen zu den nach § 7 Abs. 1 S. 1 Nr. 15 Infektionsschutzgesetz (IfSG) meldepflichtigen Krankheiten. Durchschnittlich werden in Deutschland ca. 350/Jahr autochthone Erkrankungen pro Jahr gezählt, wobei die Zahlen zwischen 200 und knapp 600 Fällen schwanken (Robert Koch-Institut 2020b). Anhand der erhobenen humanen Fallzahlen werden FSME-Risikogebiete auf Landkreis-Ebene ermittelt. Wenn in einem gleitenden Fünfjahreszeitraum die lokale Inzidenz von einem Fall pro 100.000 Einwohner überschritten wird, gilt ein Landkreis als Risikogebiet.

In ganz Deutschland gelten aktuell 164 Landkreise als Risikogebiete, 134 (82 %) davon in den südlichen Bundesländern Bayern und Baden-Württemberg. Im Jahr 2019 wurden insgesamt 444 FSME-Erkrankungen gemeldet und es sind 3 neue FSME-Risikogebiete dazu gekommen, zwei Kreise in Sachsen (Stadtkreis Dresden, Landkreis Meißen) sowie ein Kreis in Thüringen (Schmalkalden-Meiningen) (Robert Koch-Institut 2020a).

Aus epidemiologischer Sicht kann Deutschland in drei Regionen unterteilt werden: Süd-, Mittel- und Norddeutschland (DOBLER 2019). Die Region Süddeutschland besteht aus den Bundesländern Bayern und Baden-Württemberg. Seit der Einführung der Meldepflicht in § 7 Abs. 1 S. 1 Nr. 15 IfSG im Jahr 2001 wurden ca. 85 % der humanen Fälle aus diesen süddeutschen Bundesländern gemeldet (Robert Koch-Institut 2020b). Von den im Jahr 2019 übermittelten Fällen wurde bei 83 % Bayern oder Baden-Württemberg als Infektionsort angegeben (Robert Koch-Institut 2020a).

Die Region Mitteldeutschland umfasst die angrenzenden Bundesländer Hessen, Rheinland-Pfalz, Saarland, Thüringen und Sachsen. In dieser Region treten immer häufiger humane FSME-Fälle auf. Zu Beginn der Aufzeichnung 2001 wurden aus dieser Region 20 Fälle gemeldet. 2013 steigerte es sich auf 45 Fälle und 2019 wurden insgesamt 61 Fälle übermittelt (Robert Koch-Institut 2020b). Daraus folgt, dass immer mehr Landkreise als Risikogebiete klassifiziert werden. Alle 3 neuen FSME-Risikogebiete, die 2020 dazu gekommen sind, stammen aus der Region Mitteldeutschland (Robert Koch-Institut 2020a).

Die Region Norddeutschland erstreckt sich über die Bundesländer Schleswig-Holstein, Niedersachsen, Berlin, Nordrhein-Westfalen, Sachsen-Anhalt, Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg, Hamburg und Bremen. Aus dieser Region werden nur sporadisch FSME-Fälle gemeldet. Nachdem im Jahr 2018 eine im Vergleich zu den Vorjahren deutlich erhöhte Inzidenz humaner FSME-Erkrankungen zu verzeichnen war, wurde 2019 erstmals ein Landkreis (LK Emsland) aus dem nördlichen Drittel als Risikogebiet eingestuft (Robert Koch Institut 2019).

2.3.2 Übertragungszyklus des FSME-Virus

Das FSME-Virus zirkuliert in einem geografisch strikt limitierten Naturherd zwischen Kleinnagern als Reservoirwirten und Zecken als Vektoren. Die Übertragung des Sibirischen Subtyp und des Fernöstlichen Subtyp erfolgt durch *I. persulcatus*. Der Europäische Subtyp wird primär durch *I. ricinus* übertragen (DOBLER et al. 2012). In Deutschland sind zusätzlich *D. reticulatus*, *D. marginatus* und *H. concinna* als mögliche Vektoren für das FSME-Virus beschrieben (RUBEL et al. 2014; CHITIMIA-DOBLER et al. 2019).

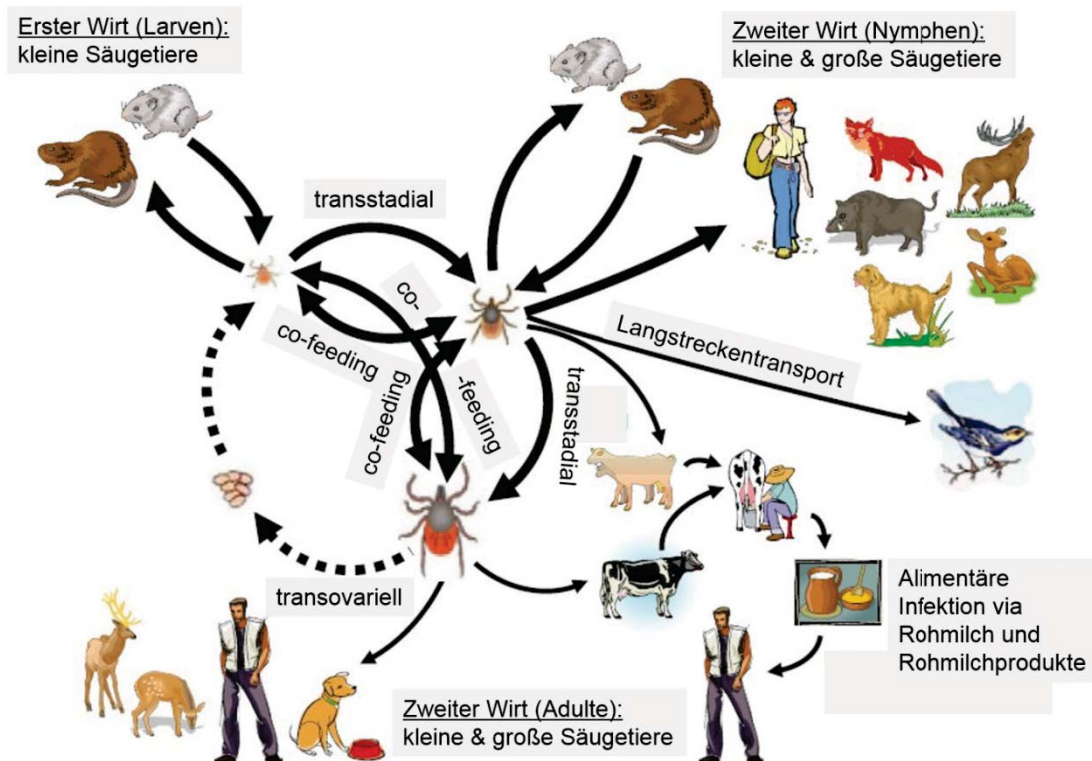


Abb. 3 Übertragungszyklus des FSME-Virus modifiziert nach PFEFFER und DOBLER (2011)

Das FSME-Virus persistiert in den Speicheldrüsen der Zecke und wird direkt nach dem Zeckenstich mit der Abgabe des Speichels auf den Wirt übertragen (ŠIMO et al. 2017). *I. ricinus* ist, wie im Abschnitt 2.2.2 beschrieben, eine dreiwirtige Zecke. Die drei blutsaugenden Stadien dieser Spezies suchen für die Blutmahlzeit ein breites Spektrum von Tierarten auf, unter anderem Weide- und Wildtiere, Haustiere, Vögel und Menschen. Besondere Bedeutung haben Gelbhalsmäuse (*Apodemus flavicollis*) und Rötelmäuse (*Myodes glareolus*) als Reservoirwirte für das FSME-Virus. Beide Arten entwickeln eine hochgradige Virämie, sodass nicht infizierte-Zecken sich während der Blutmahlzeit infizieren können (CHITIMIA-DOBLER et al. 2018).

Die Übertragung des FSME-Virus kann innerhalb einer Zeckenpopulation auf verschiedene Weise geschehen. Bei der transstadialen Übertragung bleibt die Infektion während der Häutung zu dem nächsten Zeckenstadium bestehen (NOSEK et al. 1967), dies ist vor allem für die Viruspersistenz relevant. Bei der transvariellen Übertragung wird das Virus von einem infizierten Weibchen auf einen Teil der gelegten Eier weitergegeben (DANIELOVÁ et al. 2002). Eine horizontale Übertragung kann bei der Befruchtung von einer männlichen Zecke auf das Weibchen erfolgen (ALEKSEEV 1991). Die transvarielle und horizontale Übertragung sind epidemiologisch unbedeutend für den Übertragungszyklus. Deutlich wichtiger ist der sogenannte Co-feeding-Effekt (LABUDA et al. 1997). Dabei infiziert eine FSME-Virus-tragende Zecke eine nicht infizierte Zecke, wenn diese beim Saugakt auf dem gleichen Wirt dicht nebeneinandersitzen, ohne dass eine systemische Virämie des Wirtstieres erforderlich ist. Eine vertikale Übertragung zwischen verschiedenen Kleinnager-Generationen konnte sowohl bei experimentell als auch bei natürlich infizierten Kleinnagern gezeigt werden. Dieser Übertragungsweg scheint essentiell für das Überdauern von Naturherden zu sein, wenn temporär kein kompetenter Vektor vorhanden ist (BAKHVALOVA et al. 2009).

Das FSME-Virus kann außerdem über den alimentären Infektionsweg übertragen werden. Wenn sich Milch-liefernde Tiere *via* Zeckenstich mit FSME-Viren infizieren, werden während der Virämiephase FSME-Viren über mehrere Tage mit der Milch ausgeschieden (BALOGH et al. 2012). Wird diese Milch im unpasteurisierten Zustand als Rohmilch oder Rohmilchprodukt verzehrt, ist eine Infektion mit FSME möglich (BROCKMANN et al. 2018; DOBLER et al. 2012). Durch diese effiziente Übertragung können mehrere Menschen gleichzeitig durch den Verzehr kontaminierter Rohmilch eines Wiederkäuers infiziert werden. Allerdings spielt diese Übertragung in der westlichen Welt insgesamt eine untergeordnete Rolle, da die Rohmilch standardisiert pasteurisiert wird.

2.3.3 Veterinärmedizinische Diagnostik

Im Allgemeinen werden in der Veterinärmedizin die gleichen diagnostischen Nachweismethoden wie beim Menschen verwendet. Besondere Bedeutung hat vor allem der indirekte Nachweis einer FSME-Virus-Infektion durch die Detektion spezifischer Antikörper. Am häufigsten werden dafür Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), Immunfluoreszenztest (IFT) und Neutralisationstest (NT) verwendet. Der ELISA und der IFT können allerdings nur als Screening-Methoden verwendet werden, da es innerhalb der Flaviviren zu Kreuzreaktionen kommen kann (DOBLER et al. 1996). Positive Proben müssen durch einen NT verifiziert und laut dem Europäischen Zentrum für die Prävention und die

Kontrolle von Krankheiten (ECDC) ist nur ein NT-Titer $\geq 1:10$ beweisend für eine FSME Infektion (HOLZMANN et al. 1996). Die Spezifitätstestung ist mittlerweile in Mitteleuropa notwendig, da neben dem FSME-Virus weitere Flaviviren endemisch sind (BECK et al. 2013).

2.3.4 Haus- und Wildtiere als Sentinel für das FSME-Virus

Derzeit erfolgt die Einstufung der Risikogebiete in Deutschland auf Basis der humanen Fallzahlen unabhängig von regional unterschiedlichen Impfquoten innerhalb der jeweiligen Bundesländer bzw. Landkreise oder geografischer Ungenauigkeiten der Meldungen. Bei einem Anstieg der FSME-Impfrate sinkt die Anzahl der Neuinfektionen, was zu einer falsch-negativen Einschätzung der Risikogebiete führen kann. Der Naturherd bleibt in diesen Gebieten jedoch auch ohne den Menschen als Fehlwirt weiterhin aktiv, sodass eine unbekannte Ansteckungsgefahr für nicht vakzinierte Menschen und Haustiere besteht (DOBLER et al. 2012). Zusätzlich werden jedes Jahr 3 % der autochthonen humanen Fälle außerhalb von offiziellen Risikogebieten detektiert. Demzufolge ist es notwendig, die bestehende Risikoeinschätzung zu ergänzen und anzupassen. Dies kann unter anderem durch die Suche nach einem geeigneten Sentinel für das FSME-Virus erfolgen (IMHOFF et al. 2015). Sentineltiere sind Tiere, die als Indikatoren für das Vorhandensein von Krankheitserregern dienen.

Da das Virus vor allem zwischen Zecken und Kleinnagern zirkuliert, liegt es nahe, diese als Indikator für das Infektionsrisiko zu untersuchen. Während hohe Prävalenzen von verschiedenen Pathogenen wie z. B. *Borrelia*-Arten in Zecken nachgewiesen wurden (RAUTER et al. 2005), findet man FSME-infizierte Zecken ausschließlich in kleinräumigen Naturherden mit einer Fläche von 0,5 km² (DOBLER et al. 2011; NOSEK et al. 1978). Die lokale Begrenzung der FSME-Naturherde erklärt, weshalb die Prävalenz infizierter Zecken in bekannten FSME-Risikogebieten insgesamt niedrig (0,0 bis 2,4 %) ist (STEFANOFF et al. 2013; GÄUMANN et al. 2010; KLAUS et al. 2009; FRIMMEL et al. 2014). Zecken sind deshalb nicht als Indikator für das tatsächliche Infektionsrisiko für Mensch und Tier geeignet (IMHOFF et al. 2015).

Untersuchungen aus Deutschland, den Niederlanden, Ungarn und Slowenien haben die Präsenz von FSME-Viren und/oder FSMEV-spezifischen Antikörpern in Kleinnagern analysiert und Werte von 0,0-10,2 % ermittelt (ACHAZI et al. 2011; VAN DER POEL et al. 2005; PINTÉR et al. 2014; KNAP et al. 2012). Vorteile in der Untersuchung von infizierten Nagetieren als Sentinel für FSME-Viren sind ihre quantitativ große Verfügbarkeit und die Entwicklung lange

persistierender FSME-spezifischer Antikörper. Diesen Vorteilen stehen jedoch zeit- und kostenintensive Feld- und Laborarbeiten gegenüber (IMHOFF et al. 2015).

Viele weitere Wild- und Haustiere sind Wirte von *I. ricinus* und entwickeln messbare Antikörpertiter gegen das FSME-Virus nach einer natürlichen Infektion. Besondere Bedeutung haben große und kleine Wiederkäuer, die nahe dem Menschen auf räumlich begrenzten Weiden leben. Wiederkäuer serokonvertieren, ohne klinische Symptome der Erkrankung auszubilden. Die Antikörper nach durchgemachter FSME-Virusinfektion sind bei Schafen und Ziegen für mindestens 28 Monate nachweisbar (KLAUS et al. 2014). Problematisch ist jedoch, dass die Seroprävalenzen nicht mit den humanen Fallzahlen korrelieren (KLAUS et al. 2012; STEFANOFF et al. 2008; IMHOFF et al. 2015).

Bei den Haustieren stehen vor allem Hunde und Pferde im Fokus, da diese als einzige eine klinische FSME mit neurologischer Symptomatik ausbilden (LUCKSCHANDER et al. 1999; MÜLLER et al. 2006). Ein limitierender Faktor ist die Probengewinnung, da die Besitzercompliance der Haus- bzw. Liebhabertiere sich als schwierig herausstellt. Die Aussagekraft der Studien ist durch niedrige Probenzahlen deshalb kritisch zu hinterfragen (BALLING et al. 2015; JANITZA-FUTTERER 2003).

Wildtiere wie z. B. Wildschweine, Reh- oder Rotwild sind Wirte vor allem für Nymphen und Adulte der *Ixodes*-Zecken und haben durch ihre hohe Zeckenexposition ein erhöhtes Risiko, sich mit FSME-Virus zu infizieren (VOR et al. 2010). Wildtiere serokonvertieren nach einer FSME-Infektion, bilden jedoch keine klinische Symptomatik aus (PFEFFER et al. 2018). Die Wildtiere sind essentieller Bestandteil des Lebenszyklus der Zecke und damit auch der Übertragung von FSME. Die Seroprävalenzdaten von Wildtieren sind gute Indikatoren für das FSME-Infektionsrisiko und decken zum Teil neue FSME-Naturherde auf (BALLING et al. 2014). In Belgien beispielsweise konnten bei 2,9 % der 238 untersuchten Wildschweine spezifische Antikörper nachgewiesen werden (ROELANDT et al. 2016), obwohl Belgien als frei von autochthoner FSME gilt (DOBLER et al. 2012). Diese Ergebnisse demonstrieren die Relevanz der Wildtiere als Sentinel. Derzeit beschränken sich die Untersuchungen lediglich auf Cerviden und Wildschweine.

2.3.5 Der Rotfuchs als Sentinel für das FSME-Virus

Der Rotfuchs ist in ganz Europa und vor allem in Deutschland mit hoher Populationsdichte (Abschnitt 2.1.4) verbreitet und regelmäßig mit Zecken befallen. Dennoch ist seine Rolle im FSME-Übertragungszyklus bisher weitestgehend unbekannt (PFEFFER et al. 2018).

Innerhalb von Europa parasitieren verschiedene Spezies der Zeckenfamilie Ixodidae auf der Haut von Rotfüchsen. In Deutschland besteht die Zeckenfauna des Fuchses vor allem aus *I. ricinus*, *I. canisuga*, *I. hexagonus*, *D. reticulatus*, *I. kaiseri* und *H. concinna*, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben. Von diesen sind drei Spezies, *I. ricinus*, *D. reticulatus* und *H. concinna*, als Vektoren für FSME bestätigt (KOZUCH et al. 1971; RIZZOLI et al. 2014; KOZUCH et al. 1980). Zusätzlich konnte das Virus isoliert werden in *I. hexagonus* und *I. canisuga* (RADDA 1973). Im Jahr 2014 wurde erstmals in Kroatien das FSME-Virus von Zecken, die auf Rotfüchsen parasitierten, isoliert (JEMERŠIĆ et al. 2014).

Zusätzlich wird die Möglichkeit diskutiert, ob eine alimentäre Infektion des Fuchses durch das Fressen von infizierten Kleinnagern, wie beispielsweise den bekannten FSME-Reservoirwirten *M. arvalis* und *M. agrestis* (ACHAZI et al. 2011; PINTÉR et al. 2014; TONTERI et al. 2011), möglich ist.

In den 1960er und 70er Jahren wurden experimentelle Infektionen *via* FSME-infizierter Zecken oder *via* Virusinjektion bei Rotfüchsen durchgeführt. Infolgedessen zeigten die Füchse klinische Symptome einer FSME-Erkrankung wie Fieber und Meningoenzephalitis. Zusätzlich konnten eine Virämie und hohe Antikörpertiter festgestellt werden (ERNEK et al. 1958; RADDA et al. 1969).

In älteren Seroprävalenzstudien aus Deutschland und den Niederlanden wurden Füchse aus Nicht-Risikogebieten auf FSME-Antikörper untersucht. Nur in einer der 786 Serumproben aus Deutschland und in keiner der 399 untersuchten Serumproben aus Niederlanden konnten *via* Neutralisationstest neutralisierende Antikörper gegen das FSME-Virus bestätigt werden (VAN DER POEL et al. 2005; WURM et al. 2000). RIEGER et al. (1999) ermittelten Antikörper gegen das FSME-Virus in jedem dritten Fuchs in Südwestdeutschland, allerdings wurden diese ELISA-Ergebnisse nicht verifiziert durch z. B. einen Neutralisationstest. Somit können mögliche Kreuzreaktionen mit anderen Flaviviren nicht ausgeschlossen werden (DOBLER et al. 1996). Gleiches gilt für RADDA et al. (1968), die bei 10 von 26 untersuchten Füchsen in Niederösterreich Antikörper nachweisen konnten.

Schwedische Forscher konnten zudem eine positive Korrelation zwischen der humanen FSME-Inzidenz und der Größe der Fuchspopulation feststellen (HAEMIG et al. 2008). Eine entsprechende Studie aus Deutschland konnte diese Korrelation jedoch nicht bestätigen (KIFFNER et al. 2010).

Zusammenfassend ist die Rolle des Fuchses im FSME-Übertragungszyklus weitgehend ungeklärt. Aufgrund der o. g. Eigenschaften des Fuchses stellt sich die Frage, ob und in welcher Form der Fuchs als Sentinel für das FSME-Virus geeignet ist.

3. Publikationen

3.1. Eigenanteil Publikation 1

Under the skin: *Ixodes* ticks in the subcutaneous tissue of red foxes (*Vulpes vulpes*) from
Germany

Maja Haut¹, Nina Król¹, Anna Obiegala¹, Johannes Seeger², Martin Pfeffer¹

¹Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany

²Institute of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Leipzig, An den Tierkliniken 43, 04103 Leipzig, Germany

Parasites & Vectors 2020; 13 (1):189

Impact Factor: 2,82

Eingereicht: 12.12.2019

Akzeptiert: 01.04.2020

Veröffentlicht: 21.04.2020

Stellungnahme zum Eigenanteil der Publikation:

Den Verdacht auf eine Infestation der Rotfüchse mit subkutanen Zecken habe ich selbständig entwickelt. Die Probenentnahme, die Literaturrecherche sowie die Erstellung des Manuskripts führte ich eigenständig durch. MP und AO berieten mich bei der Konzeption der Studie. NK und AO halfen mir bei den morphologischen und molekulargenetischen Untersuchungen der Proben. JS half mir bei der histologischen Untersuchung. Bei der Auswertung der Ergebnisse und Revision des Manuskripts erhielt ich Hilfe von den Coautoren.

3.1.1. Publikation 1

Haut et al. *Parasites Vectors* (2020) 13:189
<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04061-x>

Parasites & Vectors

SHORT REPORT

Open Access



Under the skin: *Ixodes* ticks in the subcutaneous tissue of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Germany

Maja Haut¹, Nina Król¹, Anna Obiegala¹, Johannes Seeger² and Martin Pfeffer^{1*}

Abstract

Background: *Ixodes* spp. are vectors of zoonotic pathogens. All three active life stages (larvae, nymphs, adults) need to feed on a host in order to develop. Usually ticks parasitize attached to the external surface of their hosts' skin. Interestingly, in some cases ticks can also be found in the subcutaneous tissue in a variety of hosts, such as red foxes (*Vulpes vulpes*), raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) and dogs.

Methods: The visceral side of 126 red fox-furs from Germany was examined visually searching for ticks. The localization of ticks was recorded and assigned to ten specific body parts. Morphological identification of ticks was performed according to standardized taxonomic protocols. Ticks which could not be further identified were examined genetically via conventional PCR targeting the 16S rRNA and *cox1* gene. Hematoxylin and eosin (H&E) staining was used for histopathological examination.

Results: In 111 out of 126 (88.1%) examined coats, at least one tick was found in the subcutaneous tissue. A total of 1203 ticks were removed from the subcutaneous tissue. Well-preserved ticks could be identified based on morphological criteria, but most ticks were in a progressed state of decomposition. Here, morphological species identification was not successful. Also, PCR methods did not lead to a successful species identification. The following species and development stages were found by morphological identification: *Ixodes ricinus* (female, *n* = 289; male, *n* = 8; nymph, *n* = 1), *I. hexagonus* (female, *n* = 2), *I. canisuga* (female, *n* = 1). Male *I. ricinus* were found individually or copulating in pairs with females. Subcutaneous ticks were localized at three predominant affected body parts: ears, axillar and inguinal region. Histological examination of subcutaneous ticks revealed a granulomatous panniculitis.

Conclusions: To the authors' knowledge, this is the first finding of highly prevalent subcutaneous ticks in red foxes from Germany. Subcutaneous location of ticks seems to be very common in red foxes and the rule rather than the exception. Deep embedment of longirostra and long feeding times of females seem to put the subcutaneous location in favor. Most foxes were infested in the inguinal area, where the skin is thin and less hairy.

Keywords: Ectoparasites, Subcutaneous, *Ixodes* spp., Tick, Red fox, Germany, Europe

Background

Ticks belonging to the genera *Ixodes* and *Dermacentor* (Family: Ixodidae) are the most prevalent in Europe [1]. All active tick life stages (six-legged larva, eight-legged nymph and females) require blood meals from hosts for molting (immatures) or for oviposition (females) with the exception of males which feed facultatively and are localized on hosts mainly for mating purposes [1, 2].

*Correspondence: Pfeffer@vetmed.uni-leipzig.de

¹ Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

In Germany the species *Ixodes ricinus*, *I. hexagonus*, *I. canisuga* and *I. kaiseri* have been frequently collected from foxes [3–8]. Additionally, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* were occasionally found attached to red foxes' skin [7, 9]. Ticks are usually strongly attached to the external surface of their hosts to remain in place for a blood meal. Thereby tick mouthparts penetrate different skin layers, depending on their length. Ticks with long mouthparts (longirostra e.g. *Amblyomma*, *Hyalomma* and *Ixodes*) embedded into deep layers of the dermis while ticks with short mouthparts (brevirostra e.g. *Dermacentor*, *Haemaphysalis* and *Rhipicephalus*) barely penetrate the epidermis [10, 11]. *Ixodes ricinus* larvae are attached for 2–4 days, nymphs for 4–6 days and females for 6–10 days [12].

Interestingly, in some cases ticks can also be found in the subcutaneous tissue in a variety of hosts including red foxes. The presence of subcutaneous ticks such as *I. ricinus*, *I. hexagonus*, *I. crenulatus* and *D. reticulatus* was noted in red foxes in several case studies from the UK, Poland, Austria, Romania, Slovakia and Czech Republic [13–20]. In the USA, the native tick species *Amblyomma americanum* was likewise discovered in the subcutaneous tissue of red foxes [21].

Besides red foxes, single case reports of subcutaneous ticks were previously recorded in raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) from Poland [22], in a dog from Sweden [23] and in a child from South Korea [24].

Hitherto, small sample sizes were reported in most cases also rather as occasional findings [13–17, 21]. Thus far, no published data exist about subcutaneous ticks in red foxes or other animals from Germany. This is why this study is aiming to evaluate the frequency of subcutaneous ticks in red foxes from Germany using a large number of samples. The localization of subcutaneous ticks at different body regions of the red fox has not been analyzed yet; therefore, we documented the localization of each tick in order to determine the abundance of these ticks in the subcutaneous tissue. Precise species identification of subcutaneous ticks based on morphological criteria is possible only to a limited extent due to the advanced degradation process in subcutaneous tissue, as seen in previous studies [18]. Hence, this study aims to use molecular biology techniques to identify subcutaneous ticks to species level.

Methods

Animal collection

Between November 2018 and February 2019 local hunters shot red foxes and other wild game in course of traditional hunting. In cooperation with a scrape station (Fellwechsel Berlin, Germany), local hunters

from all over Germany deposited fox carcasses in plastic bags labelled with the date and exact geographical location in deep-freezers. Only adult foxes with good nutritional status were selected by hunters. Fox cadavers were stored at -80°C until flaying. For enabling the histological studies one fox was skinned directly after hunting.

Tick collection and identification

The visceral side of each fur was examined visually for the presence of subcutaneous ticks. The localization of ticks was recorded on a pre-drawn schematic picture and assigned to ten specific body parts (ears, neck, axillar region, shoulder, back, belly, inguinal region, anorectal region, legs and tail) in order to create a body map of tick density (Fig. 1), as recommended by Lydecker et al. [25]. Afterwards, the ticks were individually dissected from the subcutaneous tissue with fine-tipped forceps and a scalpel and stored at -20°C (Fig. 2). Well-preserved ticks could be identified based on morphological criteria according to standardized taxonomic protocols [26] under a binocular at $50\times$ magnification (Motic SMZ-171, Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Germany).

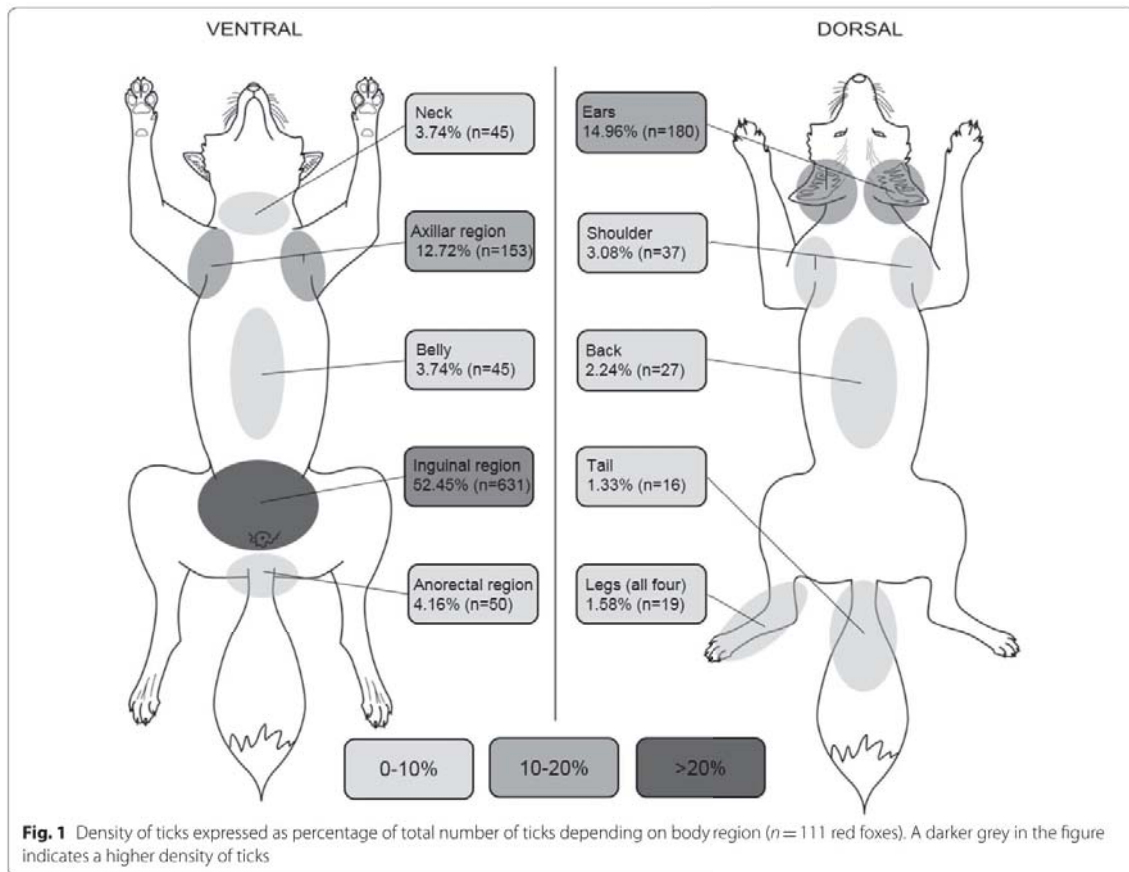
DNA extraction and PCR methods

Ticks which could not be morphologically identified were further processed by conventional PCR to identify them to species level. For the DNA extraction, 1 g of steel beads (sized 2.8 mm) and 500 μl of PBS were added to each tick. The samples were then homogenized at $5000\times \text{rpm}$ for $2\times 15\text{ s}$ with 15 s break intervals in a Precellys[®]24 tissue homogenizer (Bertin Technologies, Montigny Le Bretonneux, France).

The genomic DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. PCR amplifications of partially cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox1*) gene (710 bp) and of the 16S ribosomal ribonucleic acid (rRNA) gene (455 bp) were performed using previously published PCR protocols [8, 27]. PCR products were visualized by gel electrophoresis on 2% agarose gels stained with HDGreen Plus DNA Stain (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Germany).

Histological examination of subcutaneous tissue

Subcutaneously located ticks were removed with the skin and the surrounding tissue from the complete fur and immediately fixed in 10% buffered formalin, dehydrated in ascending ethanol series (20–100%) and embedded in paraffin blocks. Seven-micron thick sections were cut with a rotary microtome (Leica RM 2155, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany), placed on glass slides and stained with hematoxylin and



eosin (H&E). Microscopy and pictures were performed using a Zeiss Axioplan 2 imaging (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) equipped with an objective 25 $\times$ /0.8 Plan-Neofluar Oil and a color camera ProgRes C14 (Jenoptik, Jena, Germany). Whole section overviews were obtained by tile scans with a 25 $\times$ /0.8 Plan-Neofluar Oil objective using a tile scan routine under Openlab 5.5 (Improvision, Coventry, UK). During histological examination it was noticed that the inflammatory response was related to the stage of degradation of the tick. Therefore, the ticks were divided into 3 categories: (i) well-preserved ticks with correct position of hypostome and the appendages and intact exoskeleton and body; (ii) deformed ticks with intact exoskeleton; and (iii) ticks with broken, fully deformed exoskeleton.

Statistical analysis

Confidence intervals (95% CI) for prevalence rates of subcutaneous ticks and their life stage were determined

by the Clopper & Pearson method with GraphPad Software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The Mann-Whitney U-test with a significance level of $\alpha = 0.05$ was used to compare the different body regions. The independence of compared small sample sizes ($n < 30$) was tested with Fisher's exact test. Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0 (IBM Corp, Armonk, NY, USA).

Results

Animal collection

For the present study 126 red foxes (75 males and 51 females), were collected and examined from central [federal states of Brandenburg ($n = 1$); Hessen ($n = 2$); North Rhine-Westphalia ($n = 56$); Saxony ($n = 3$); and Thuringia ($n = 5$)] and northern Germany [federal states of Lower Saxony ($n = 45$); and Schleswig-Holstein ($n = 14$)].



Fig. 2 Macroscopic view on ticks with subcutaneous localization. **a** One tick lifted up with a fine-tipped forceps and other ticks in the surrounding tissue. **b** Ticks in advanced stages of decomposition. **c** Well-preserved ticks in dorsal (black arrow) and ventral position (red arrow)

Tick collection

In 111 out of 126 (88.1%, 95% CI: 81.13–93.18%) examined coats, at least one tick was found in the subcutaneous tissue. The frequency of the occurrence of subcutaneous ticks between male and female foxes did not differ significantly ($P < 0.590$). The tick burden per fox varied from 1 to 79, with a mean of 10.8 (SD = 14.02). Most of the foxes (69.0%) were infested with a maximum of 10 ticks (Fig. 3). A total of 1203 ticks were removed

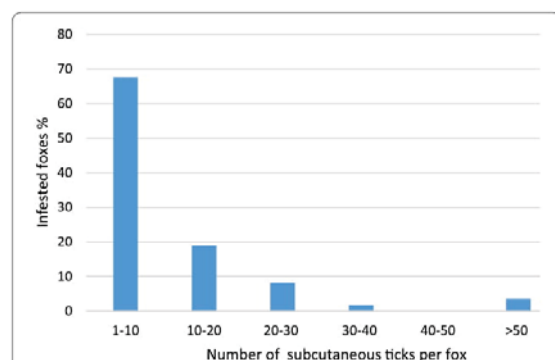


Fig. 3 The distribution of tick burden diverged between 1 to 79, a total of 1203 ticks could be removed. Most of the foxes were infested with only a small number of ticks

from the subcutaneous tissue. Morphological features of the Ixodidae, like the presence of a dorsal scutum or mouthparts anteriorly attached and visible dorsally, were present in all ticks found. Most ticks ($n = 902$; 75%) were in a progressed state of decomposition and the developmental stage as well as the species level could not be determined. However, specific criteria were met to assign the ticks to the family Ixodidae. In these cases, species identification using molecular biological methods was not successful. Well-preserved ticks ($n = 301$; 25.0%) could be identified to the species level based on morphological criteria. The following species and developmental stages were found (Table 1): *Ixodes ricinus* (female, male, nymph); *I. hexagonus* (female); *I. canisuga* (female). The most prevalent life stage were females (97.0%; $n = 292/301$, 95% CI: 94.40–98.62%) followed by males

Table 1 Tick species and life stages of well-preserved ticks found in the subcutaneous tissue

Tick species	No. of ticks (%)	No. of males	No. of females	No. of nymphs
<i>I. ricinus</i>	298 (99.0)	8	289	1
<i>I. hexagonus</i>	2 (0.7)		2	
<i>I. canisuga</i>	1 (0.3)		1	
Total (%)	301 (100)	8 (2.7)	292 (97.0)	1 (0.3)

(2.7%; $n=8/301$, 95% CI: 1.15–5.17%) and nymphs (0.3%; $n=1/301$, 95% CI: 0.01–1.84%). Females were identified most frequently as *I. ricinus* (99.0%; $n=289/292$, 95% CI: 97.03–99.79%). All male ticks belonged to *I. ricinus* and were mainly found as mating pairs with females ($n=6/8$), but also individually ($n=2/8$).

Subcutaneous localization of ticks

Subcutaneous ticks were localized at all 10 defined body parts. Significantly, most ticks were found in the inguinal area compared to all other body regions ($U_{(2268)}=262431.00$, $Z=-26.629$, $P<0.001$). Overall, 52.5% ($n=631/1203$) of all collected ticks were found in this region, distributed among 91 out of 111 infested foxes. Compared to all other regions most foxes were infested with subcutaneous ticks in the inguinal area ($P<0.0059$ to $P<0.0001$; Table 2). The second and third most common body region were the areas around the ears and the axilla. In total, 80.2% ($n=964$) of all collected ticks were observed in these three body regions (Fig. 1). Further regions showed a significantly lower burden of subcutaneous ticks ($U_{(5292)}=2072521.50$, $Z=-30.909$, $P<0.001$). The difference in the distribution of subcutaneous ticks between female and male foxes was not statistically significant for the most frequently infested body parts (inguinal region: $U_{(126)}=1711.00$, $Z=-1.015$, $P=0.310$; axillar region: $U_{(126)}=1869.00$, $Z=-0.274$, $P=0.784$; ears $U_{(126)}=1743.50$, $Z=-0.889$, $P=0.374$).

Histological studies of subcutaneous tissue

In total, 23 subcutaneous ticks collected from one fox were histologically examined (Fig. 4). Only one tick was

assigned to category 1, 11 belonged to category 2, and 11 to category 3. Ticks of category 1 were surrounded by a moderate granulomatous inflammation of subcutaneous fat tissue (panniculitis) consisting of histiocytes, macrophages, multinuclear giant cells and eosinophils. Neutrophils were only occasionally seen. A mild dermal inflammatory response was present with mild exocytosis of inflammatory cells in the epidermis. Histiocytes, macrophages and eosinophils were the most common cells observed. Additionally, moderate epidermal inter- and intracellular edema and moderate lamellar orthokeratotic hyperkeratosis were found. Intradermal and intracorneal pustules filled mainly with neutrophils and rarely with macrophages were present.

A high degree of deformation of ticks was visible in most of the histological sections. The presence of ticks of category 2 resulted in a mild granulomatous panniculitis composed of histiocytes, macrophages, multinuclear giant cells, eosinophils and sparse neutrophils.

In the inner part of the ticks of category 1 and 2 no soft tissue of the arthropod could be identified, and no cellular structures were recognizable. The broken exoskeleton of ticks belonging to category 3 was filled with a mixed inflammatory cell infiltrate consisting of histiocytes, macrophages and multinuclear giant cells. These ticks were surrounded by a severe granulomatous panniculitis without inflammatory changes of dermis and epidermis.

Histological examination of ticks with surrounding tissue and skin confirmed the subcutaneous localization. Increasing eosinophilic granulomatous inflammation from category 1 to 3 were observed. During histopathological examination no blood degradation products were observed.

Discussion

Foxes are important hosts for a variety of endo- and ectoparasites and thereby reservoirs for animal pathogens and zoonoses [28]. The observed prevalence of subcutaneous ticks (38.1%) in the present study is higher than in Poland (38%) [20] and Czech Republic/Romania (15.4%) [18]. Moreover, the prevalence of subcutaneous ticks is higher in comparison with external tick prevalence in red foxes from Italy (7.4%) [29] and Romania (53.9%) [30], but coincides to studies from Spain (51.1–84.6%) [31–33] and Germany (76.5–82.6%) [7, 34]. Additionally, the infestation intensity of subcutaneous ticks (mean = 10.8) in the present study is similar to external ticks from another study examining 1268 foxes in Germany (mean = 11.7) [34]. In that study, 50.9% of foxes were infested with a maximum of 5 ticks on their external surface, while in the present study 43.2% of the foxes were infested with a maximum of 5 ticks. However, in some cases both subcutaneous and external ticks were collected numerously

Table 2 In the majority of fox furs subcutaneous ticks were found in more than one body region. But significantly most foxes were infested in the inguinal region in a direct paired comparison with all other body regions

Body part	No. of infested foxes (%)
Ears	69/126 (54.8)**
Neck	28/126 (22.2)***
Axillar region	35/126 (27.8)***
Shoulder	20/126 (15.9)***
Back	13/126 (10.3)***
Belly	21/126 (16.7)***
Inguinal region	91/126 (72.2)
Anorectal region	18/126 (14.3)***
Legs	13/126 (10.3)***
Tail	6/126 (4.8)***

* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$

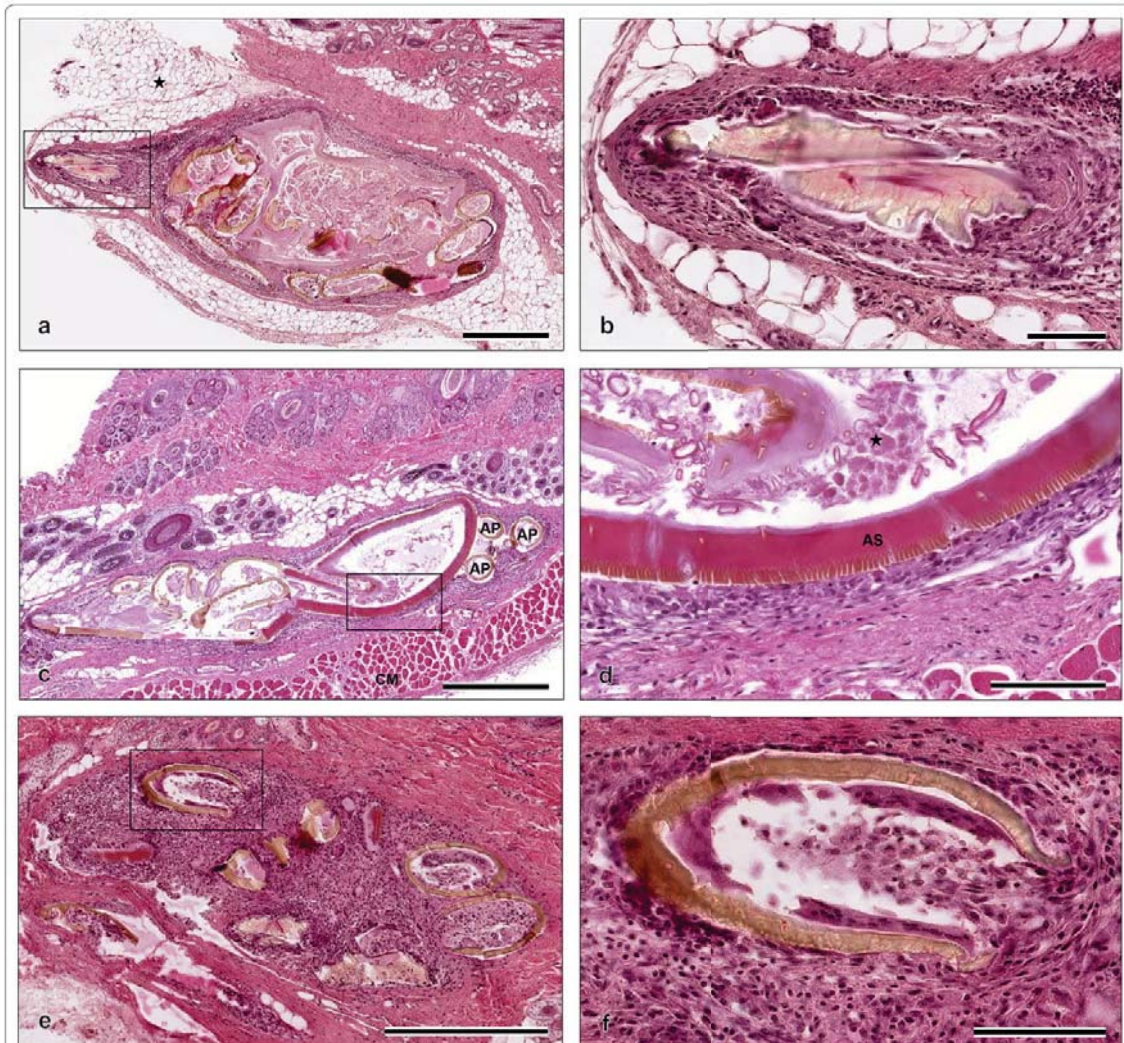


Fig. 4 Histological examination of ticks located in the subcutaneous tissue of a red fox from Germany. **a** Well-preserved tick of category 1 in the subcutaneous fat tissue (marked by asterisk) (H&E). **b** The hypostome of the tick from **a** at a higher magnification. The hypostome is surrounded by a mixture of inflammatory cells and a fibrous capsule (H&E). **c** A deformed tick of category 2 in the subcutaneous tissue above the cutaneous muscle (*panniculus carnosus*) (CM). Three appendages (AP) are visible, but due to high deformation of the tick not assignable to legs or palpi (H&E). **d** Magnification of alloscutum (AS), the inner part of the tick and the surrounding inflammation of the tick from **c**. The inner part of the tick contains of cell debris (marked by asterisk) without any cellular structure (H&E). **e** The broken parts of exoskeleton of category 3 tick (H&E). **f** Infiltration of broken exoskeleton with inflammatory cells consisting of histiocytes, eosinophils and multinuclear giant cells (H&E). Scale-bars: **a**, **c**, **e**, 500 μ m; **b**, **d**, **f**, 100 μ m

from a few foxes (3.6–5.7%) with more than 50 ticks per fox [7].

In Europe, several ticks of the genera *Ixodes*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma* and *Rhipicephalus* are known to parasitize red foxes [7, 8, 29, 31, 32]. In Germany, *I. ricinus*, *I. hexagonus*, *I. canisuga* and *I. kaiseri* were commonly collected from foxes, while *D. reticulatus*

and *H. concinna* were occasionally found [7, 9]. Accordingly, we found three of the previously mentioned longirostral species (*I. ricinus*, *I. hexagonus* and *I. canisuga*) in the subcutaneous tissue. Likewise, previously published data from USA and Czech Republic/Romania show regional differences of tick species in the subcutaneous tissue depending on the prevailing tick fauna [18, 20, 21].

Longirostra (e.g. *Amblyomma*, *Hyalomma* and *Ixodes*) embed more deeply to the hosts skin in comparison to brevirostra (e.g. *Dermacentor*, *Haemaphysalis* and *Rhipicephalus*) which attach more superficially [10, 11]. In the current study, exclusively *Ixodes* ticks were collected from the subcutaneous tissue of the foxes. These findings are in line with published records of subcutaneous ticks, where *Ixodes* ticks dominated over *Dermacentor* spp. which were found only occasionally [18, 20]. The deep embedment (as in longirostra) was previously discussed to be favorable for the subcutaneous location of ticks [18]. Our findings are in line with this assumption as longirostra were significantly more often found subcutaneously in comparison to brevirostra.

The feeding period of ixodid ticks depends on the tick's developmental stage and varies between several days (immatures) up to two weeks (females) [12]. D'Amico et al. [18] highlighted that a long feeding duration is putting ticks in favor of being found in the subcutaneous tissue. In agreement with this, significantly more females were found subcutaneously (97.0%; $P < 0.0001$) when compared to males and nymphs in the current study. Male *I. ricinus* are feeding facultatively, taking small blood meals and remain on the host searching for females to mate [1]. Facultative feeding may explain why only two males were found individually in subcutaneous location. It cannot be ruled out that copulating males are separated from females during degradation process or preparation of ticks. Male *Ixodes* can remain in copulation for 6–11 days throughout the feeding periods of female *Ixodes* [35], which may also explain why *I. ricinus* mating pairs are found in the subcutaneous tissue. Rare findings of nymphs, and none of larvae, may be related to their shorter hypostome. Additionally, a shorter feeding duration of immature ticks may explain their absence. So far, the duration and mechanism causing the subcutaneous localization of ticks are unknown, but long feeding times of females seems to be crucial for penetration.

In this study, subcutaneous ticks were usually located at three predominant body parts: ears, axillar and inguinal area, which is in line with previous studies. Smith et al. [21] reported subcutaneous ticks in the inguinal, axillar and perianal region, while Drozd [14] found ticks in subcutaneous location in the area of ears, shoulder and belly. Neither of these reports provide information about the frequency of occurrence. The present study identified the most significant infested body parts of red foxes. Strikingly, these body parts are less hairy, folded and the skin is thin. This is in concordance with ESCCAP Guidelines Control of Ectoparasites in Dogs and Cats, which generally found the same preferences for tick attachment in dogs and cats [36].

So far, the subcutaneous presence of ticks was mostly reported from red foxes [13–21]. Only single case reports of subcutaneous ticks in raccoon dogs and from one single domestic dog exists at the moment [22, 23]. In a study inspecting 134 roe deer furs from inside and outside, only external ticks were found and none in the subcutaneous tissue [37]. Thus far, little is currently known about this phenomenon, leaving questions concerning the mechanisms as to how ticks become subcutaneous and which animals can be affected.

Histological examination revealed that the quality of the inflammatory response is related to the stage of degradation of the tick. All subcutaneous ticks were surrounded by granulomatous panniculitis, these findings agree with D'Amico et al. [18]. When the exoskeleton was intact, the inflammation was mild-moderate. But in case of broken exoskeletons a severe inflammatory response was present. The one well-preserved tick showed an acute and local mechanical irritation of dermis and epidermis. This could be a sign that this tick has recently penetrated the skin. The inner part of the ticks' intact exoskeleton contained a mixture of cell debris and no cellular structure was recognizable, which may explain why DNA isolation was not successful.

Conclusions

Subcutaneous location of ticks seems to be very common in red foxes and is rather the rule than the exception. They were predominantly located at less hairy, thin and folded skin body parts of the fox. The unusual tick location is not linked to one tick species or development stage, however, mainly female longirostra were found. Decisive factors for the subcutaneous location of ticks appear to be the deep embedment of longirostra and long duration time of attachment of females. Further examinations are needed to evaluate the mechanism leading to the subcutaneous localization of ticks. Nevertheless, this phenomenon is not an evolutionary advantage for ticks, as all collected ticks were dead and at various stages of decomposition.

Abbreviations

CI: Confidence interval; cox1: Cytochrome c oxidase subunit 1; DNA: Deoxyribonucleic acid; H&E: Hematoxylin and eosin; PBS: Phosphate-buffered saline; PCR: Polymerase chain reaction; Rpm: Revolutions per minute; rRNA: Ribosomal ribonucleic acid; SD: Standard deviation.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Andreas Leppmann, Josef Segbers, Peter Truch, Stefan Birka and all local hunters for providing the fox carcasses. Many thanks go to Gabriele Linder and Dana Rüster for help in the laboratory. Thanks to the Bioluminescence Core Facility at the Saxon Incubator of Clinical Translation for microscopy and histological imaging. We also acknowledge Kristin Klose for

help in describing the pathological changes. Publication of this paper has been sponsored by Bayer Animal Health in the framework of the 15th CVBD World Forum Symposium.

Authors' contributions

MP conceived the study. Animals and ticks were collected by MH, MH, NK and AO carried out the morphological identification and nucleic acid extraction of the ticks. MH curated the data collection. JS and MH performed the histology. MH, AO, NK and MP drafted the manuscript. MH and AO carried out statistical analyses. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Parts of the study were funded by Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Project No. W1244427.

Availability of data and materials

The data supporting the conclusions of this article are included within the article. The raw data used and/or analyzed during the present study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

All hunted animals were collected in accordance with German Hunting Regulations, during the legal hunting season, and as part of legal hunting activities. No live animal was harmed for this study.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹ Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany. ² Institute of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 43, 04103 Leipzig, Germany.

Received: 12 December 2019 Accepted: 1 April 2020

Published online: 21 April 2020

References

- Oliver JH. Biology and systematics of ticks (Acari:Ixodida). *Annu Rev Ecol Syst.* 1989;20:397–430.
- Stanek G. Büchse der Pandora: Krankheitserreger in *Ixodes ricinus*-Zecken in Mitteleuropa. *Wien Klin Wochenschr.* 2009;121:673–83.
- Cornely M, Schultz U. Zur Zeckenfauna Ostdeutschlands. *Angew Parasitol.* 1992;33:173–83.
- Heidrich J. Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in eastern Brandenburg. Berlin: PhD Thesis, Freie Universität Berlin; 2000.
- Liebesch A, Walter G. Ticks of domestic and wild animals in Germany: on the occurrence and biology of the hedgehog tick (*Ixodes hexagonus*) and the fox tick (*Ixodes canisuga*). *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift.* 1986;93:447–50.
- Schöffel I, Schein E, Wittstadt U, Hentsche J. Zur Parasitenfauna des Rotfuchses in Berlin (West). *Berl Muench Tierarztl Wochenschr.* 1991;104:153–7.
- Meyer-Kayser E, Hoffmann L, Silaghi C, Pfister K, Mahling M, Passos LMF. Dynamics of tick infestations in foxes in Thuringia, Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012;3:232–9.
- Hornok S, Sándor AD, Beck R, Farkas R, Beati L, Kontschán J, et al. Contributions to the phylogeny of *Ixodes (Pholeoixodes) canisuga*, *I. (Ph.) kaiseri*, *I. (Ph.) hexagonus* and a simple pictorial key for the identification of their females. *Parasit Vectors.* 2017;10:545.
- Liebesch G, Hoffmann L, Pfeifer F, Liebesch A. Ticks of the red fox and their significance for Lyme borreliosis. *Zentralblatt für Bakteriologie.* 1997;286:246–7.
- Slovák M, Štbrániová I, Hajnická V, Nuttall PA. Antiplatelet-derived growth factor (PDGF) activity in the saliva of ixodid ticks is linked with their long mouthparts. *Parasite Immunol.* 2014;36:32–42.
- Marquardt WC, Kondratieff BC. *Biology of disease vectors*. 2nd ed. Burlington: Elsevier Academic Press; 2005.
- Gern L. Life cycle of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and transmission to humans. *Curr Probl Dermatol.* 2009;37:18–30.
- Nuttall GH. Penetration of *Ixodes* beneath the skin. *Parasitology.* 1914;7:258–9.
- Drozd J. Penetration of *Ixodes ricinus* under the skin of the host. *Acta Parasitol Polon.* 1958;6:383–5.
- Hiniday HK. Die Parasitenfauna des Rotfuchses, *Vulpes vulpes* (L.), in Österreich. *Zbl Ve. Med B.* 1971;18:21–32.
- Lebeda M. Findings of *Ixodes ricinus* in the deep layers of the skin and in the lymphatic ganglion (lymph node) of foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinarsky Casopis Bratislava.* 1962;11:193–205.
- Tovornik D. Penetration of ticks (Ixodidae) in the deep layers of the host's skin. *Biol Vestnik.* 1984;32:117–20.
- D'Amico G, Juránková J, Tábáran FA, Frgelecová L, Forejtek P, Matei IA, et al. Occurrence of ticks in the subcutaneous tissue of red foxes, *Vulpes vulpes* in Czech Republic and Romania. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017;8:309–12.
- Pet'ko B, Stanko M. Finding of the tick *Ixodes ricinus* under the skin of a fox in Slovakia. *Folia Vet.* 1991;21:159–62.
- Dwuźnik D. Ectoparasites of red fox *Vulpes vulpes* with peculiar focus on ticks in the subcutaneous tissues. *Ann Parasitol.* 2019;65:250.
- Smith DD, Fienkel JK, Smith EI. Intradermal infestation of a red fox (*Vulpes vulpes*) by the lone star tick (*Amblyomma americanum*). *J Wildl Dis.* 1986;22:122–4.
- Matysiak A, Wasielewski O, Włodarek J, Ondrejčková A, Tryjanowski P. First report of ticks in the subcutaneous tissue of the raccoon dog *Nyctereutes procyonoides*. *Veterinarni Medicina.* 2018;63:571–4.
- Zakrisson G. Ticks, *Ixodes ricinus* in the subcutaneous tissues of a dog and foxes. *Svensk Veterinärtidning.* 2010;62:25–7.
- Chang SH, Park J-H, Kwak JE, Joo M, Kim H, Chi JG, et al. A case of histologically diagnosed tick infestation on the scalp of a Korean child. *Korean J Parasitol.* 2006;44:157–61.
- Lydecker HW, Banks PB, Hochuli DF. Counting ticks (Acari: Ixodida) on hosts is complex: a review and comparison of methods. *J Med Entomol.* 2019;56:1527–33.
- Estrada-Peña A, Mihalca AD, Petney T, editors. *Ticks of Europe and North Africa: a guide to species identification*. Cham: Springer; 2018.
- Li J, Wu S, Zhang Y, Zhang T, Feng C, Jia G, et al. Development of a DNA barcoding system for the Ixodida (Acari: Ixodida). *Mitochondrial DNA.* 2013;25:142–9.
- Otranto D, Cantacessi C, Dantas-Torres F, Brianti E, Pfeiffer M, Genchi C, et al. The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe Part II: helminths and arthropods. *Vet Parasitol.* 2015;213:24–37.
- Lorusso V, Li RP, Dantas-Torres F, Mallia F, Ravagnan S, Capelli G, et al. Ixodid ticks of road-killed wildlife species in southern Italy: new tick-host associations and locality records. *Exp Appl Acarol.* 2011;55:293–300.
- Sándor AD, D'Amico G, Gherman CM, Dumitrache MO, Domşa C, Mihalca AD. Mesocarnivores and macroparasites: altitude and land use predict the ticks occurring on red foxes (*Vulpes vulpes*). *Parasit Vectors.* 2017;10:173.
- Sobrino R, Millán J, Oleaga A, Gortázar C, de la Fuente J, Ruiz-Fons F. Ecological preferences of exophilic and endophilic ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing wild carnivores in the Iberian Peninsula. *Vet Parasitol.* 2012;184:248–57.
- Dominguez-Peñafiel G, Giménez-Pardo C, Gegúndez M, Lledó L. Prevalence of ectoparasitic arthropods on wild animals and cattle in the Las Merindades area (Burgos, Spain). *Parasite.* 2011;18:251–60.
- Dominguez G. North Spain (Burgos) wild mammals ectoparasites. *Parasite.* 2004;11:267–72.
- Meyer-Kayser E, Hoffmann L, Silaghi C, Passos LMF, Mahling M, Pfister K. Tick infestation of foxes in Thuringia with special focus on foxes with scabies. *Vet Med Austria.* 2011;98:292–6.
- Kocan KM, de la Fuente J, Coburn LA. Insights into the development of *Ixodes scapularis*: a resource for research on a medically important tick species. *Parasit Vectors.* 2015;8:592.

36. ESCCAP. ESCCAP Guideline 03 sixth edition - March 2018 - control of ectoparasites in dogs and cats. Malvern: ESCCAP; 2018. https://www.esccap.org/uploads/docs/mjy50wev_0720_ESCCAP_Guideline_GL3_v9_1p.pdf. Accessed 10 Dec 2019.
37. Król N, Chitima-Dobler L, Dobler G, Karliuk Y, Birka S, Obiegala A, Pfeffer M. Tick burden on European roe deer (*Capreolus capreolus*) from Saxony, Germany, and detection of tick-borne encephalitis virus in attached ticks. *Parasitol Res*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06637-z>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



3.2. Eigenanteil Publikation 2

3.2.1. Publikation 2

The red fox (*Vulpes vulpes*) as a sentinel for tick-borne encephalitis virus in endemic and non-endemic areas

Maja Haut¹, Philipp Gierl², Beate Oswald², Thomas Romig³, Anna Obiegala¹, Gerhard Dobler² and Martin Pfeffer¹

¹Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany

²Bundeswehr Institute of Microbiology, German National Consultant Laboratory for TBEV, Neuherbergstraße 11, 80937 Munich, Germany

³Department of Parasitology, Hohenheim University, Emil-Wolff-Straße 34, 70599 Stuttgart Germany

Microorganisms 2020; 8 (11):1817

Impact Factor: 4,15

Eingereicht: 14.10.2020

Akzeptiert: 15.11.2020

Veröffentlicht: 18.11.2020

Stellungnahme zum Eigenanteil der Publikation:

Die Konzeption dieser Studie erfolgte mit Hilfe von MP und AO. Die Probenentnahme führte ich eigenständig durch, zusätzlich erhielt ich Proben von TR. PG, BO und GD halfen mir bei der diagnostischen Untersuchung der Proben. Die Literaturrecherche sowie die Erstellung des Manuskripts führte ich eigenständig durch. Bei der Auswertung der Ergebnisse und Revision des Manuskripts erhielt ich Hilfe von den Coautoren.



Article

The Red Fox (*Vulpes vulpes*) as Sentinel for Tick-Borne Encephalitis Virus in Endemic and Non-Endemic Areas

Maja Haut ¹, Philipp Grl ², Beate Oswald ², Thomas Romig ³, Anna Obiegala ¹,
Gerhard Dobler ^{2,3} and Martin Pfeffer ^{1,*} 

¹ Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany; Maja.Haut@vetmed.uni-leipzig.de (M.H.); Anna.Obiegala@vetmed.uni-leipzig.de (A.O.)

² German National Consultant Laboratory for TBEV, Bundeswehr Institute of Microbiology, 80937 Munich, Germany; Philipp1Grl@bundeswehr.org (P.G.); BeateOswald@bundeswehr.org (B.O.); gerharddobler@bundeswehr.org (G.D.)

³ Parasitology Unit, Institute of Zoology, University of Hohenheim, 70599 Stuttgart, Germany; Thomas.Romig@uni-hohenheim.de

* Correspondence: Pfeffer@vetmed.uni-leipzig.de; Tel.: +49-341-9738152

Received: 14 October 2020; Accepted: 15 November 2020; Published: 18 November 2020



Abstract: Tick-borne encephalitis (TBE) is one of the most important viral zoonosis caused by a neurotropic arbovirus (TBEV). In Germany, TBE is classified as a notifiable disease with an average of 350 autochthonous human cases annually. The incidence-based risk assessment in Germany came under criticism because every year, a number of autochthonous human TBE cases have been detected outside of the official risk areas. Therefore, it is necessary to find additional parameters to strengthen TBEV surveillance. The aim of this study was to examine red foxes as sentinels for TBE. Thus far, there are no published data about the sensitivity and specificity for serological methods testing fox samples. Hence, we aimed to define a system for the screening of TBEV-specific antibodies in red foxes. A total of 1233 fox sera were collected and examined by ELISA and IIFA and confirmed by micro-NT. The overall seroprevalence of antibodies against TBEV in red foxes from Germany confirmed by micro-NT was 21.1%. The seroprevalence differed significantly between risk (30.5%) and non-risk areas (13.1%), with good correlations to local TBE incidence in humans. In conclusion, serological monitoring of red foxes represents a promising surrogate marker system and may even determine unexpected TBEV foci in regions currently regarded as non-risk areas.

Keywords: Flavivirus; ELISA; IIFA; micro-NT; seroprevalence; TBE; Europe

1. Introduction

Tick-borne encephalitis (TBE) is a medically relevant viral zoonosis transmitted through bites of certain tick species. TBE is caused by the tick-borne encephalitis virus (TBEV), which belongs to the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*. According to Ecker et al. (1999), TBEV can be divided into three subtypes: European, Siberian and Far Eastern subtype [1]. However, recent findings suggest a division of TBEV in at least five genetic subtypes. In addition to the three named subtypes, a Baikalian [2] and a Himalayan subtype [3] have been described. The Siberian and Far Eastern subtypes are mainly transmitted by *Ixodes persulcatus*, while the European subtype mainly uses *Ixodes ricinus* as a vector.

All subtypes of TBEV circulate between small mammals as main reservoir hosts, other mammalian hosts, and ixodid ticks as vectors in geographically limited natural foci [4]. The concept of the natural focus was initially formulated by Pavlovsky shortly after TBEV was isolated [5]. According to our

current understanding, a natural focus consists of one small area of 0.005 km² ('microfocus') located within a larger area ('macrofocus'), which extends 1 km around the microfocus [6,7]. In the microfocus, an active continuous transmission of TBEV between ticks and rodents takes place while rodents or other larger animals like foxes, wild boars, or deer transport the infected ticks into the macrofocus [6,8]. Due to the synanthropic behavior of many wild animals, such as red foxes, the risk of dispersal of TBEV-infected ticks into villages and towns increases [6,9].

Currently, TBEV foci have been reported in Europe, Siberia, far-eastern Russia, northern China, South Korea, and Japan, with approximately 10,000–12,000 human cases per year [10]. Since the introduction of mandatory reporting in Germany in 2001, an average of 350 autochthonous human cases have been notified annually [11]. In Germany, TBE risk areas are defined on a district level by a minimal incidence of 1 case per 100,000 inhabitants in a gliding five-year period [12]. Besides the different geographical scale, in comparison with the natural focus, further drawbacks of this definition are that they disregard the vaccination rates and geographical inaccuracies, as notification is done by the place of living of the patient rather than the place of infection. Furthermore, humans are only incidental hosts and up to 70% of human infections are estimated to manifest without or with only mild clinical symptoms, which usually does not lead to any diagnostic examinations. In consequence, increasing vaccination rates may reduce the number of clinical TBE cases and thus the number of official TBE risk areas, although there is a continuous circulation of TBEV in the natural foci and thus a continuous risk of human infections. Additionally, in Germany, every year around 3% of the autochthonous human TBE cases are detected outside of the official risk areas [11]. Therefore, it is necessary to find suitable alternative parameters for TBEV surveillance to complement or modify the existing risk assessment based solely on the number of human cases [13,14].

In epidemiological studies, testing of wild animals or domestic animals by serological means has proven to be the best method for the evidence of TBEV infections [15]. For this purpose, different serological test formats are used. The most common screening methods are the indirect immunofluorescence assay (IIFA) and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The difficulty here is that both screening systems show cross-reactivity to antibodies of other flaviviruses [16]. Hence, it is necessary to distinguish between specific anti-TBEV antibodies and antibodies against other flaviviruses by using, e.g., an additional neutralization test (NT). According to the European Centre for Disease Prevention and Control, only an NT titer $\geq 1:10$ confirms a positive result [17].

Many wild and domestic animals (e.g., roe deer, wild boar, dogs, goats, sheep) are hosts for ticks and can develop measurable antibody titers against TBEV upon natural infection and were previously investigated as potential new indicators of TBE infection risk [18–20]. Although red foxes are possible transporters of *Ixodes* spp. ticks into human habitat [21], and are predators of potentially TBEV-infected rodents [22], there are no recent studies investigating the TBEV seroprevalence in foxes. In previous studies from Germany and the Netherlands, only one serum sample was confirmed by a neutralization test. The remaining fox sera were only tested by ELISA or were negative in NT [14,23,24]. However, Swedish researchers found a positive correlation between TBE incidence and fox abundance [21], while a study from Germany described the opposite effect [25].

These contradictory findings clearly demonstrate the necessity of a seroprevalence study in areas with known endemicity status in order to see whether or not foxes develop antibodies upon infection, which might be useful as a surrogate marker for TBE endemic areas. Thus far, there are no studies calculating the sensitivity and specificity of commercial serological test systems for foxes. Therefore, an additional aim of this study was the comparison of serological methods to select the best for TBEV antibody detection in foxes. Subsequently, we determined the seroprevalence of antibodies against TBEV in red foxes from Germany in risk areas and non-risk areas and correlated TBE incidence in humans and fox seroprevalence in order to estimate the potential of red foxes as possible sentinels of human TBE risk.

2. Materials and Methods

2.1. Animal Collection and Serum Samples

Between December 2016 and February 2020, we collected foxes from local hunters shot during traditional hunting. This was done in cooperation with a scrape station (Fellwechsel GmbH, Berlin, Germany) and an echinococcosis project of the Parasitology Unit of the University of Hohenheim. Local hunters from all over Germany deposited fox carcasses in plastic bags labelled with the date and exact geographical location in deep freezers. Only adult foxes with good nutritional status were selected by hunters for 'Fellwechsel', while juvenile foxes were also shot for the project of the university. Fox cadavers were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fellwechsel) or $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (University) until flaying (Fellwechsel) or parasitological diagnostic examination (University).

For the extraction of thoracic fluid, 5 mL of Phosphate-buffered saline (PBS) were flushed into the thorax of fox carcasses. Alternatively, if the thorax was destroyed, the heart of the foxes was punctured and flushed with 5 mL of PBS. The flushing liquid of both was centrifuged (10 min at $2000\times g$) and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, further considered as serum samples.

2.2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

All serum samples were tested using the Immunozyg FSME IgG All Species ELISA (Progen, Heidelberg, Germany) according to the manufacturer's instructions. Serum samples were tested in a dilution of 1:50 and measured in Vienna Units per milliliter (VIEU/mL). An ELISA reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) was used for the colorimetric reading at the 450-nm wavelength. Sera with concentration >126 VIEU/mL were considered as positive, sera from 63–126 VIEU/mL as borderline, and concentrations <63 VIEU/mL were considered as negative.

2.3. Indirect Immunofluorescence Assay (IIFA)

All positive and borderline sera were also tested in an indirect immunofluorescence assay (IIFA). Additionally, 71 randomly chosen fox sera from TBE endemic areas, which were tested negative in ELISA, were also tested in IIFA. For the IIFA analysis, the Euroimmun Anti-TBEV-IIFT (FSME-Viren [TBEV], Euroimmun AG, Luebeck, Germany) was used. Serum samples were used with a dilution of 1:10 with PBS. A 20- μL aliquot of each sample was spotted on a field of the TBE microchip and incubated for 30 min at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a humidified atmosphere. After washing 3 times in PBS, 10 μL of anti-dog FITC conjugate were added and again incubated for 30 min at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a humidified incubator. After 3 washing steps in PBS, the slides were mounted with 10% glycerol in PBS and checked for specific immunofluorescence. In each field, an infected field was opposite to a field with non-infected cells as a control for unspecific fluorescence.

2.4. Micro-Neutralization Test (Micro-NT)

In order to avoid false positive results, all ELISA- and IIFA-positive sera were confirmed by micro-NT as the ECDC requires NT titers of $\geq 1:10$ to be regarded as confirmed positive for TBE-specific antibodies. Additionally, all negative samples were re-tested for the purpose of determining the sensitivity and specificity of ELISA and IIFA.

Micro-NT analysis of serum samples was performed according to standard procedure as described before [26]. In brief, virus stocks (50 TCID₅₀/50 μL) were prepared from TBE (strain Neudörfl) cultivated in A549 cells and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further use. Using 96-well culture plates (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany), all micro-NTs were performed on confluent cell monolayers. Serum samples were tested in duplicates, diluted in Minimal Essential Medium (MEM, plus Non-Essential Amino Acids Solution and Antibiotic-Antimycotic Solution; all Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Germany) in a ratio of 1:10. As a control, a known positive and a known negative serum sample were used on each plate together with a mock control and a virus back-titration. Diluted serum samples were pre-incubated with virus for one hour before adding the serum virus suspension to the wells.

Supernatants were discarded after an incubation period of 96 h at 37 °C (5% CO₂), and the 96-well plates were fixed and stained in 13% formalin/0.1% crystal violet and results determined optically. Samples were classified as either “micro-NT-positive” (titer $\geq$ 1:10) if there was complete inhibition of the cytopathic effect in both wells of the cell culture or “micro-NT-negative” (titer < 1:10) otherwise.

2.5. Statistical Analysis

The independence of compared sample sizes over 50 was tested with Chi-square test. Correlations between the seroprevalence of TBE-specific antibodies in red foxes in risk and non-risk areas and the local TBE incidence in humans were evaluated using Pearson’s correlation coefficient and Spearman’s rank correlation coefficient. Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics for Windows, v. 25.0 (IBM Corp, Armonk, NY, USA).

3. Results

3.1. Animal Collection

In total 1233 red fox serum samples were collected. Of these, 59.0% ($n = 728/1233$) were from male foxes, 40.2% ($n = 496/1233$) from female foxes, and in 0.7% ($n = 9/1233$), the gender could not be determined due to extensive damage of the lower abdomen. Most of the foxes were adult (98.5%; $n = 1214/1233$) and only 1.5% ($n = 19/1233$) were juvenile. For the present study, sera were collected from districts all over Germany. To enhance the accuracy of our analyses, these districts were divided into TBE risk ($n = 568/1233$; 46.1%) (Table 1) and TBE non-risk areas ($n = 665/1233$; 53.9%) according to the Robert Koch-Institute [27] (Table 2).

Table 1. Seroprevalence of TBEV-specific antibodies in red foxes collected in TBE risk areas in Germany. Seroprevalences were only determined for those districts where 10 or more foxes were sampled.

Federal State	District	No. of Sera	No. of Pos. ¹ Sera	Seroprev (%)
Baden-Württemberg	Alb-Donau-Kreis	1	0	n.d. ²
	City of Baden-Baden	1	1	n.d.
	Biberach/Alb-Donau Kreis	1	0	n.d.
	Böblingen	1	0	n.d.
	Bodenseekreis	17	8	47.1
	Breisgau-Hochschwarzwald-Kreis	21	5	23.8
	Emmendingen	20	11	55.0
	Enzkreis	3	1	n.d.
	Esslingen	3	0	n.d.
	City of Freiburg im Breisgau	5	3	n.d.
	Göppingen	44	14	31.8
	Göppingen/Ostalbkreis	1	0	n.d.
	Heidelberg	2	2	n.d.
	Heilbronn	6	1	n.d.
	Hohenlohekreis	2	1	n.d.
	Karlsruhe	12	3	25.0
	Konstanz	11	5	45.5
	Lörrach	8	3	n.d.
	Ludwigsburg	24	6	25.0
	Main-Tauber-Kreis	3	2	n.d.
	Neckar-Odenwald-Kreis	12	3	25.0
	Ostalbkreis	14	4	28.6
	Rastatt	2	1	n.d.
	Ravensburg	113	41	36.3
	Rems-Murr-Kreis	10	2	20.0
	Reutlingen	3	1	n.d.
	Rhein-Neckar-Kreis	5	2	n.d.
	Rottweil	1	1	n.d.
	Schwäbisch Hall	2	0	n.d.

Table 1. Cont.

Federal State	District	No. of Sera	No. of Pos. ¹ Sera	Seroprev (%)
	Schwarzwald-Baar-Kreis	16	9	56.3
	Sigmaringen	43	21	48.8
	Tübingen	5	0	n.d.
Bavaria	Ansbach	16	5	31.3
	Eichstätt	1	0	n.d.
	Günzburg	11	1	9.1
	Miltenberg	1	1	n.d.
	München	1	0	n.d.
	Neustadt an der Waldnaab	1	0	n.d.
	Roth	3	1	n.d.
	City of Würzburg	1	1	n.d.
Hessen	Bergstraße	1	0	n.d.
	Groß-Gerau	1	1	n.d.
	Offenbach am Main	1	0	n.d.
	Main-Kinzig-Kreis	5	1	n.d.
Lower Saxony	Emsland	18	2	11.1
Saxony	Bautzen	8	1	n.d.
	Erzgebirgskreis	17	1	5.9
	Meißen	33	1	3.0
	Sächsische Schweiz- Osterzgebirge	8	1	n.d.
	Vogtlandkreis	4	1	n.d.
	Zwickau	14	2	14.3
Thuringia	Gera	1	0	n.d.
	Greiz	1	0	n.d.
	Ilm-Kreis	8	2	n.d.
	Saale-Orla-Kreis	1	0	n.d.
Total		568	173	30.5

¹ Pos.: positive; ² n.d.: not detected.

Table 2. Seroprevalence of TBEV-specific antibodies in red foxes collected in TBE non-risk areas in Germany. Seroprevalences were only determined for those districts where 10 or more foxes were sampled.

Federal State	District	No. of Sera	No. of Pos. ¹ Sera	Seroprev. (%)
Baden-Württemberg	City of Heilbronn	1	0	n.d. ²
Brandenburg	Elbe-Elster	1	0	n.d.
	Oder-Spree	2	0	n.d.
	Teltow-Fläming	3	1	n.d.
	Uckermark	3	0	n.d.
Brandenburg/Saxony Anhalt	Havelland/Stendal	2	0	n.d.
Hesse	Fulda	9	3	n.d.
	Gießen	2	0	n.d.
	Hersfeld-Rotenburg	1	0	n.d.
	Kassel	2	0	n.d.
	Main-Taunus-Kreis	1	0	n.d.
	Rheingau-Taunus-Kreis	1	0	n.d.
	Waldeck-Frankenberg	3	0	n.d.
	Wetteraukreis	26	2	7.7
Lower Saxony	Cloppenburg	6	2	n.d.
	Cuxhaven	3	1	n.d.
	Delmenhorst	1	0	n.d.
	Diepholz	9	2	n.d.
	Gifhorn	1	0	n.d.
	Göttingen	1	0	n.d.

Table 2. Cont.

Federal State	District	No. of Sera	No. of Pos. ¹ Sera	Seroprev. (%)
	Grafschaft-Bentheim	6	2	n.d.
	Hameln-Pyrmont	6	0	n.d.
	Harburg	1	0	n.d.
	Nienburg / Weser	7	2	n.d.
	Osnabrück	21	2	9.5
	Peine	11	2	18.2
	Region Hannover	2	2	n.d.
	Schaumburg	4	1	n.d.
	Stade	5	0	n.d.
	Vechta	8	0	n.d.
	Verden	7	3	n.d.
	Wolfenbüttel	2	0	n.d.
Mecklenburg-Western Pomerania	Ludwigslust-Parchim	2	0	n.d.
	Mecklenburgische Seenplatte	5	0	n.d.
	Rostock	1	0	n.d.
	Vorpommern-Greifswald	10	0	0.0
	Vorpommern-Rügen	2	0	n.d.
North-Rhine Westphalia	Borken	12	4	33.3
	Coesfeld	9	2	n.d.
	Ennepe-Ruhr-Kreis	5	2	n.d.
	Gütersloh	16	2	12.5
	Hamun	1	0	n.d.
	Herford	14	1	7.1
	Hochsauerlandkreis	7	0	n.d.
	Höxter	6	0	n.d.
	Kleve	10	2	20.0
	City of Bielefeld	7	2	n.d.
	City of Düsseldorf	1	0	n.d.
	City of Gelsenkirchen	12	4	33.3
	City of Hagen	2	0	n.d.
	City of Leverkusen	2	0	n.d.
	Lippe	11	0	0.0
	Mettmann	11	0	0.0
	Minden-Lübbecke	15	5	33.3
	Paderborn	2	0	n.d.
	Recklinghausen	1	1	n.d.
	Rhein-Neuss-Kreis	30	2	6.7
	Siegen-Wittgenstein	1	0	n.d.
	Soest	41	2	4.9
	Steinfurt	13	2	15.4
	Unna	4	1	n.d.
	Warendorf	11	2	18.2
	Wesel	9	2	n.d.
Rhineland-Palatinate	Altenkirchen/Westerwaldkreis	2	0	n.d.
	Alzey-Worms	4	1	n.d.
	Bad Dürkheim	5	2	n.d.
	Bitburg-Prüm	1	1	n.d.
	Germersheim	1	0	n.d.
	Kaiserslautern/Kusel	1	0	n.d.
	Mainz-Bingen	3	0	n.d.
	Neuwied	1	1	n.d.
	Rhein-Lahn-Kreis	1	0	n.d.
Saxony	Westerwaldkreis	2	0	n.d.
	Görlitz	36	2	5.6
	City of Leipzig	1	0	n.d.
	Leipzig	15	0	0.0
	Nordsachsen	3	1	n.d.

Table 2. Cont.

Federal State	District	No. of Sera	No. of Pos. ¹ Sera	Seroprev. (%)
Saxony-Anhalt	Anhalt-Bitterfeld	8	1	n.d.
	Börde	2	1	n.d.
	Burgenlandkreis	4	0	n.d.
	City of Dessau-Roßlau	5	0	n.d.
	Harz	10	0	0.0
	Jerichower Land	6	0	n.d.
	City of Magdeburg	1	0	n.d.
	Mansfeld-Südharz	3	0	n.d.
	Saalekreis	2	0	n.d.
	Salzlandkreis	11	1	9.1
	Wittenberg	15	1	6.7
Schleswig Holstein	Dithmarschen	3	0	n.d.
	Nordfriesland	12	4	33.3
	Pinneberg	8	1	n.d.
	Plön	1	0	n.d.
	Rendsburg-Eckernförde	9	1	n.d.
	Schleswig-Flensburg	4	1	n.d.
	Segeberg/Steinburg	1	0	n.d.
	Steinburg	1	0	n.d.
	Stormarn	5	0	n.d.
Thuringia	Stormarn/Herzogtum Lauenburg	6	0	n.d.
	Erfurt	6	1	n.d.
	Gotha	6	1	n.d.
	Sömmerda	8	1	n.d.
	Unstrut-Hainich-Kreis	7	3	n.d.
Total	Weimarer Land	14	1	7.1
		665	87	13.1

¹ Pos.: positive; ² n.d.: not detected.

3.2. ELISA

On the whole, 121/1233 samples were positive or borderline by TBE ELISA (Table 3). Among these sera, 110 samples could be confirmed by micro-NT. In total, 150 additional sera were positive in the micro-NT, which yielded negative results in the ELISA. In total, 973 samples were confirmed to be negative for TBEV-specific antibodies by micro-NT. Of these, 11 samples tested positive by ELISA. Therefore, the sensitivity of the Immunozyg FSME IgG All Species ELISA (Progen, Heidelberg, Germany) was 42.3% in classifying all positive and borderline ELISA samples as positive. The specificity of the Immunozyg FSME IgG All Species ELISA was 98.9%.

Table 3. Results of ELISA in comparison with Neutralization Test (NT) as gold standard, resulting in sensitivity and specificity.

ELISA		NT		Total
		positive	negative	
	positive	110	11	121
	negative	150	962	1112
	Total	260	973	1233
		Sensitivity 42.3%		Specificity 98.9%

3.3. IIFA

In total, 192 samples were tested by IIFA. Of these, 138 samples were considered positive. However, 26 samples, which showed a positive reaction in IIFA, were negative in micro-NT and thus not confirmed. On the other hand, out of the 54 samples that tested negative by IIFA, 11 were tested positive in the micro-NT. As the results of ELISA and micro-NT corresponded better, a further testing of samples using IIFA was discontinued because an even lower specificity and sensitivity was expected for this screening method.

3.4. Micro-NT

By using only sera confirmed by micro-NT, the overall seroprevalence of antibodies against TBEV in foxes from Germany was 21.1% ($n = 260/1233$). The prevalence of TBEV-specific antibodies in male and female foxes did not differ significantly ($\chi^2 = 0.241$, $df = 1$, $p = 0.6238$). In TBE risk areas, the seroprevalence was 30.5% ($n = 173/568$), and in non-risk areas only 13.1% ($n = 87/665$). Significantly more foxes from TBE risk areas developed TBEV-specific antibodies in comparison with foxes from non-risk areas ($\chi^2 = 35.184$, $df = 1$, $p < 0.001$). For calculation of this correlation, only districts were selected where 10 or more foxes were sampled. The TBEV seroprevalence in foxes from risk areas correlated significantly with the human TBE incidence in these areas ($r_s = 0.608$, $p = 0.006$, $n = 19$; $r = 0.608$, $p = 0.006$, $n = 19$), but the correlation in non-risk areas was not significant ($r_s = -0.346$, $p = 0.1006$, $n = 23$; $r = -0.282$, $p = 0.192$, $n = 23$). The geographical distribution of foxes with TBEV-specific antibodies are shown in Figure 1.

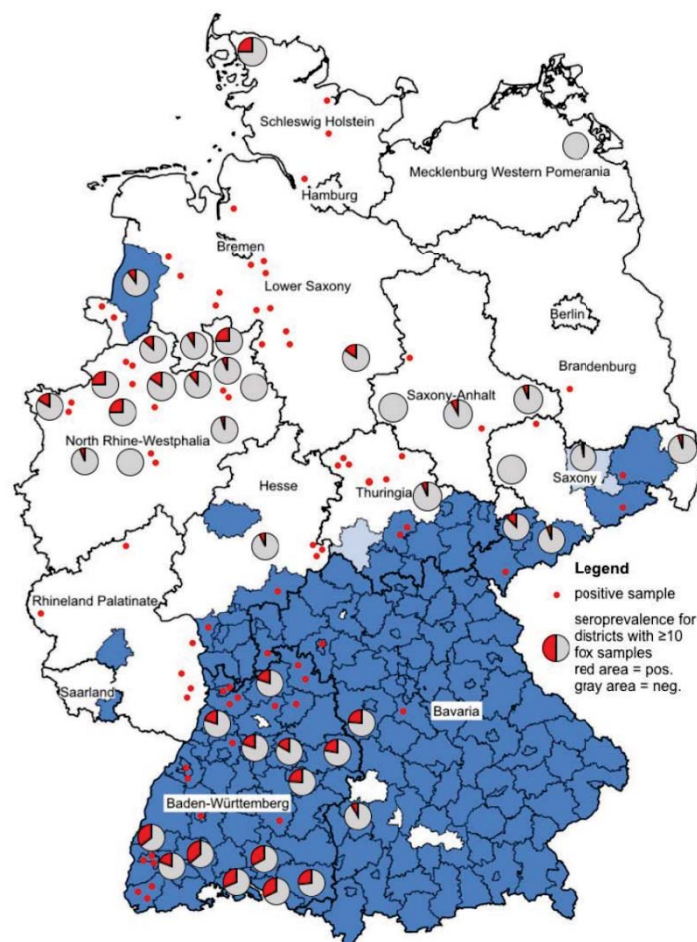


Figure 1. Blue colored are the TBE risk areas (counties, NUTS 3 level) according to Robert Koch Institute [27]. The lighter blue are the districts that were newly accounted for TBE risk areas in 2020. Pie charts were created for the districts where 10 or more foxes were examined. The red areas of the pie charts stand for the positive foxes, the gray ones for the negatively tested foxes. Positive foxes from districts where less than 10 foxes were sampled are represented by a red dot. Please note that negative foxes ($n = 315$) from districts where less than 10 foxes were sampled are not shown in this figure.

4. Discussion

An important aim of our study was to define a system that allows the screening of TBEV-specific antibodies in red foxes. Thus far, no published data existed about the sensitivity and specificity of commercially available screening methods for the detection of antibodies against TBEV in sera from red foxes. Therefore, a commercially available ELISA kit (Immunozyt FSME IgG All Species ELISA) and a commercially available IIFA assay (Euroimmun Anti-TBEV-IIFT) were compared using the NT as the “gold standard”. However, after testing 192 samples, further use of IIFA was discontinued because the specificity of IIFA was even lower than that of the ELISA (Tables 4 and 5). The sensitivity of both test systems at this intermediate stage is comparably high, as mainly positive samples were tested.

Table 4. Intermediate results of 192 samples tested by ELISA in comparison with NT as the gold standard, resulting in sensitivity and specificity.

ELISA	NT			Total
		positive	negative	
	positive	110	11	
	negative	13	58	
	Total	123	69	
		Sensitivity 89.4%	Specificity 84.1%	

Table 5. Intermediate results of 192 samples tested by IIFA in comparison with NT as the gold standard, resulting in sensitivity and specificity.

IIFA	NT			Total
		positive	negative	
	positive	112	26	
	negative	11	43	
	Total	123	69	
		Sensitivity 91.1%	Specificity 62.3%	

After all, 1233 samples were tested by ELISA and NT, the ELISA showed a sensitivity of 42.3% and specificity of 98.9% (Table 3). Klaus et al. (2011) detected similar levels of sensitivity and specificity using the Immunozyt FSME IgG All Species ELISA for goat serum samples [28]. Apparently, this ELISA is a good method for diagnosis of acute TBEV infection, but positive serum samples may be missed if the antibody titer is low after a long-lasting natural infection or when using diluted serum samples (manuscript in preparation). Hence, a two-step diagnostic system with a screening ELISA or IIFA and a confirmatory NT might not be suitable for epidemiological investigations. The question therefore arises whether for epidemiological investigations, for example, the search for a suitable sentinel, only an NT should be performed.

The neutralization test is the most specific and sensitive assay, which exploits the capacity of antibodies to neutralize infectious viruses [16,28]. Several different formats are available, for example, it is possible to perform a plaque reduction neutralization test, assessing the serum dilution at which the number of viral plaque-forming units is reduced by 50% or 90% [29], or to assess the tissue culture infectious dose by the microneutralization test [16]. However, the major disadvantages of NT are the need of a BSL3 laboratory for TBE culture, the requirement of highly trained staff, and high time consumption [30]. We designed a protocol for a microneutralization test, which was done with only one dilution and in duplicate. The advantage of this test format is that up to 40 sera can be tested in one 96-well plate and therefore this test may be suitable for mass testing in epidemiological studies. As for epidemiological studies, time is not a critical factor, and this disadvantage of NT for acute diagnosis might not be relevant. Additionally, one advantage of NT is that it works species independently. Therefore, the presented micro-method can be recommended for epidemiological investigation of any species of wild animals.

A further difficulty is the poor quality of serum samples from fox carcasses and other wild animals [13,18]. Due to extensive hemolysis, contamination, or toxic effects, the evaluation by NT is sometimes impossible [18]. We prepared our samples by centrifugation and inactivation at 56 °C to eliminate possible contaminations, other pathogens and the complement factors [31,32].

The second major aim of the study was to explore the potential of red foxes as predictive sentinels for TBE risk. In accordance with Gerth et al. (1995), the ideal sentinel should meet four conditions: “have an adequately limited home range, be available in large numbers, be well dispersed in the surveillance area, and should show a long-lasting antibody response after natural infection” [33]. The use of the home range of foxes depends on the availability of resources and habitat, hence the home range size of rural foxes is 2 km² and of urban foxes 0.5 km² [9]. Furthermore, the high adaptability of foxes, their omnivorous diet, and the absence of natural enemies contribute to a broad distribution in Europe [34–36]. The duration of antibody response in foxes is still unknown, but after experimental infection via infected ticks or virus injection, foxes show clinical symptoms like fever and meningoencephalitis, a viremia, and high antibody titers [37,38].

In addition, the ideal sentinel should be exposed frequently to tick species known as vectors of TBEV [13]. In Europe, tick infestation of foxes ranges from 7.4% in Italy [39] to 51.1–82.6% in Spain [40] and Germany [41]. Several tick species of the genera Ixodes, Dermacentor, Haemaphysalis, Hyalomma, and Rhipicephalus are known to parasitize red foxes’ skin [39,40,42,43]. Of these, three species, *I. ricinus*, *D. reticulatus*, and *H. concinna*, are known to be able to transmit TBEV. Moreover, the virus has been isolated from *I. hexagonus*, *I. canisuga*, *H. punctata*, and *I. trianguliceps*, typical members of the tick fauna of red foxes in Europe [44]. In Croatia, TBEV has been isolated from *I. ricinus* and *I. hexagonus* ticks removed from red foxes [45].

In conclusion, the red fox meets all the requirements to be a suitable indicator for TBE risk assessment, which is also confirmed by our results. The observed seroprevalence of TBEV antibodies reflects the TBE infection rate in Germany, with significant differences between risk ($n = 173/568$; 30.5%) and non-risk areas ($n = 87/665$; 13.1%). At least 87 TBEV-positive fox serum samples were from districts officially classified as non-risk areas. These include one district in Brandenburg; two districts in Hesse and Saxony; four districts each in Rhineland-Palatinate, Saxony-Anhalt, and Schleswig-Holstein; five districts in Thuringia; 10 in Lower Saxony, and 16 in North-Rhine-Westphalia. Although most of these districts are only represented by a small sample size, these examples demonstrate the tremendous power of using foxes to detect new areas of TBEV activity. In addition, as all samples become diluted by the flushing fluid during sampling, an even higher seroprevalence might be expected. As a possible consequence of our findings, the search for TBEV-positive ticks in these districts may be considered in order to find the exact locations of the new TBE natural foci.

To our knowledge this study shows for the first time a remarkably high prevalence of NT-verified TBEV-specific antibodies in red foxes. In older studies from Germany and the Netherlands, mostly foxes from non-endemic areas were tested and revealed 0% seroprevalence or only one positive sample [23,24]. So far, only one study was performed in a TBE-endemic area in Germany, where the prevalence of antibodies was up to 34.2%; however, the results were not confirmed by NT [14].

Ideally, in epidemiological studies, in each district, the same number of foxes should be sampled. In this case, the determined prevalence can be compared and a meaningful map can be created. The figure in our study is partially misleading, because not all 1233 samples could be represented. The ratio of positive and negative foxes from districts where 10 or more foxes were examined is shown in pie charts. We visualized the localization of the remaining positive foxes by red dots. However, for clarity reasons, the remaining negative foxes ($n = 315$) from districts where less than 10 foxes were sampled are not shown in this figure. The majority of these foxes came from non-risk areas. For detailed data, see Tables 1 and 2.

The seroprevalence of TBEV-specific antibodies in red foxes from risk areas was found to be significantly associated with the human TBE incidence. This positive correlation demonstrates that foxes are useful to screen for TBE endemicity. Our findings are in line with a study in TBE-endemic

areas in Sweden, where the relationship between the red fox population and human TBE incidence was found to be positive [21]. However, this is in contrast to a study in endemic areas of Germany, which described the opposite effect [25].

The relationship between the seroprevalence of foxes from non-risk areas and human TBE incidence was not statistically significant. We found seroprevalences up to 33.3% in districts where the human TBE incidence is 0.0% (City of Gelsenkirchen, Minden-Lübbecke, Nordfriesland) [27]. In none of these districts have human TBE cases been registered so far. There is a need for investigations to see if these discrepancies may be due to low pathogenic TBEV strains that cause human infection with inapparent clinical course. However, since human TBE cases are also known outside of the defined risk areas every year, we hypothesize that such cases are due to TBE foci yet to be discovered. Investigation of fox seroprevalences could help to locate such TBE foci. We conclude that the red fox is a suitable predictive sentinel and can complement the human incidence-based risk assessment.

5. Conclusions

Serological monitoring of red foxes appears to be a promising approach to complement the present TBE risk assessment. For epidemiological studies, a two-step diagnostic system with ELISA or IIFA and confirmatory NT is not useful because of the low sensitivity of ELISA and low specificity of IIFA.

Author Contributions: Conceptualization, M.P.; sampling, M.H. and T.R.; methodology, M.H., P.G., B.O. and G.D.; validation, M.H., M.P. and G.D.; data curation, M.H. and P.G.; writing—original draft preparation, M.H.; writing—review and editing, A.O., G.D., T.R. and M.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Pfizer Pharma GmbH, Berlin, project number WI244427.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge Andreas Leppmann, Josef Segbers, Peter Truch and all local hunters for providing the fox carcasses. Many thanks go to Dana Rüster, Elisabeth Schmidt and Dorothea Thoma for their help during sampling and support in the laboratory. The help of all participants of the echinococcosis project 'LÉml' in Baden-Württemberg is gratefully acknowledged.

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

References

1. Ecker, M.; Allison, S.L.; Meixner, T.; Heinz, F.X. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J. Gen. Virol.* **1999**, *80*, 179–185. [\[CrossRef\]](#)
2. Kovalev, S.Y.; Mukhacheva, T.A. Reconsidering the classification of tick-borne encephalitis virus within the Siberian subtype gives new insights into its evolutionary history. *Infect. Genet. Evol.* **2017**, *55*, 159–165. [\[CrossRef\]](#)
3. Dai, X.; Shang, G.; Lu, S.; Yang, J.; Xu, J. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerg. Microbes Infect.* **2018**, *7*, 74. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Dobler, G.; Gniel, D.; Petermann, R.; Pfeffer, M. Epidemiology and distribution of tick-borne encephalitis. *Wien Med. Wochenschr.* **2012**, *162*, 230–238. [\[CrossRef\]](#)
5. Pavlovsky, E.N. Natural focalities of infectious and parasitic diseases. *Vestn. Akad. Nauk. SSSR* **1939**, *10*, 98–108.
6. Dobler, G.; Hufert, T.; Pfeffer, M.; Essbauer, S. Tick-borne encephalitis: From microfocus to human disease. In *Parasitology Research Monographs 2: Progress in Parasitology*; Mehlhorn, H., Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, Germany, 2011; pp. 323–331.
7. Nosek, J.; Kozuch, O.; Mayer, V. Spatial distribution and stability of natural foci of tick-borne encephalitis virus in Central Europe. *Sitz. Heidelb. Akad. Wiss.* **1978**, *2*, 60–74.
8. Radda, A.; Kunz, C.; Hofmann, H. Nachweis von Antikörpern in Wildseren zur Erfassung von Herden des Virus der Frühsommer-Meningo-Enzephalitis FSME) in Niederösterreich. *Zentralbl. Bakteriол. Orig.* **1968**, *208*, 88–93.
9. Janko, C.; Schröder, W.; Linke, S.; König, A. Space use and resting site selection of red foxes (*Vulpes vulpes*) living near villages and small towns in Southern Germany. *Acta Theriol* **2012**, *57*, 245–250. [\[CrossRef\]](#)

10. Erber, W.; Schmitt, H.-J.; Janković, T.V. Epidemiology by country—An overview. In *The TBE Book*; Dobler, G., Erber, W., Schmitt, H.-J., Eds.; Global Health Press Pte Ltd.: Singapore, 2018; pp. 114–127, ISBN 978-981-11-1903-3.
11. Robert Koch-Institut. SurvStat@RKI 2.0. Available online: <https://survstat.rki.de> (accessed on 13 October 2020).
12. Robert Koch-Institut. FSME: Risikogebiete in Deutschland (Stand: Januar 2007): Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos. *Epid. Bull.* **2007**, *15*, 129–137.
13. Imhoff, M.; Hagedorn, P.; Schulze, Y.; Hellenbrand, W.; Pfeffer, M.; Niedrig, M. Review: Sentinels of tick-borne encephalitis risk. *Ticks Tick Borne Dis.* **2015**, *6*, 592–600. [\[CrossRef\]](#)
14. Rieger, M.A.; Nübling, M.; Müller, W.; Hasselhorn, H.-M.; Hofmann, F. Foxes as indicators for TBE endemicity—A comparative serological investigation. *Zent. Bakteri.* **1999**, *289*, 610–618. [\[CrossRef\]](#)
15. Pfeffer, M.; Leschnik, M. TBE in animals—disease, infection source, reservoir host, and sentinel for human infection risk. In *The TBE Book*; Dobler, G., Erber, W., Schmitt, H.-J., Eds.; Global Health Press Pte Ltd.: Singapore, 2018; pp. 91–103, ISBN 978-981-11-1903-3.
16. Litzba, N.; Zelená, H.; Kreil, T.R.; Niklasson, B.; Kühnmann-Rabens, I.; Remoli, M.E.; Niedrig, M. Evaluation of different serological diagnostic methods for tick-borne encephalitis virus: Enzyme-linked immunosorbent, immunofluorescence, and neutralization assay. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2014**, *14*, 149–159. [\[CrossRef\]](#)
17. Holzmann, H.; Kundi, M.; Stiasny, K.; Clement, J.; McKenna, P.; Kunz, C.; Heinz, F.X. Correlation between ELISA, hemagglutination inhibition, and neutralization tests after vaccination against tick-borne encephalitis. *J. Med. Virol.* **1996**, *48*, 102–107. [\[CrossRef\]](#)
18. Balling, A.; Plessow, U.; Beer, M.; Pfeffer, M. Prevalence of antibodies against tick-borne encephalitis virus in wild game from Saxony, Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* **2014**, *5*, 805–809. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Balling, A.; Beer, M.; Gniel, D.; Pfeffer, M. Prevalence of antibodies against Tick-Borne Encephalitis virus in dogs from Saxony, Germany. *Berl. Muench. Tierarztl. Wochenschr.* **2015**, *128*, 297–303.
20. Klaus, C.; Beer, M.; Saier, R.; Schau, U.; Moog, U.; Hoffmann, B.; Diller, R.; Süß, J. Goats and sheep as sentinels for tick-borne encephalitis (TBE) virus-epidemiological studies in areas endemic and non-endemic for TBE virus in Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* **2012**, *3*, 27–37. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Haemig, P.D.; Lithner, S.; De Luna, S.S.; Lundkvist, A.; Waldenström, J.; Hansson, L.; Arneborn, M.; Olsen, B. Red fox and tick-borne encephalitis (TBE) in humans: Can predators influence public health? *Scand. J. Infect. Dis.* **2008**, *40*, 527–532. [\[CrossRef\]](#)
22. Lutz, W. Beitrag zur Nahrung des Rotfuchses (*Vulpes vulpes* [L.]) im “Nationalpark Bayerischer Wald”. *Z. Jagdwiss* **1978**, *24*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
23. Wurm, R.; Dobler, G.; Peters, M.; Kiessig, S.T. Serological investigations of red foxes (*Vulpes vulpes* L.) for determination of the spread of tick-borne encephalitis in Northrhine-Westphalia. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* **2000**, *47*, 503–509. [\[CrossRef\]](#)
24. Van der Poel, W.H.M.; van der Heide, R.; Bakker, D.; de Looft, M.; de Jong, J.; van Manen, N.; Gaasenbeek, C.P.H.; Borgsteede, F.H.M. Attempt to Detect Evidence for Tick-Borne Encephalitis Virus in Ticks and Mammalian Wildlife in the Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2005**, *5*, 58–64. [\[CrossRef\]](#)
25. Kiffner, C.; Zucchini, W.; Schomaker, P.; Vor, T.; Hagedorn, P.; Niedrig, M.; Rühe, F. Determinants of tick-borne encephalitis in counties of southern Germany, 2001–2008. *Int. J. Health Geogr.* **2010**, *9*, 42. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. OIE. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 7th ed.; OIE: Paris, France, 2012; ISBN 978-92-9044-878-5.
27. Robert Koch-Institut. FSME: Risikogebiete in Deutschland. *Epid. Bull.* **2020**, *8*, 3–19. [\[CrossRef\]](#)
28. Klaus, C.; Beer, M.; Saier, R.; Schubert, H.; Bischoff, S.; Süß, J. Evaluation of serological tests for detecting tick-borne encephalitis virus (TBEV) antibodies in animals. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **2011**, *124*, 443–449. [\[PubMed\]](#)
29. Dobler, G. Diagnosis. In *The TBE Book*; Dobler, G., Erber, W., Schmitt, H.-J., Eds.; Global Health Press Pte Ltd.: Singapore, 2018; pp. 276–282, ISBN 978-981-11-1903-3.
30. Di Gennaro, A.; Lorusso, A.; Casaccia, C.; Conte, A.; Monaco, F.; Savini, G. Serum neutralization assay can efficiently replace plaque reduction neutralization test for detection and quantitation of West Nile virus antibodies in human and animal serum samples. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* **2014**, *21*, 1460–1462. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

31. Roehrig, J.T.; Hombach, J.; Barrett, A.D.T. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. *Viral Immunol.* **2008**, *21*, 123–132. [\[CrossRef\]](#)
32. Thomas, S.J.; Nisalak, A.; Anderson, K.B.; Libraty, D.H.; Kalayanaroj, S.; Vaughn, D.W.; Putnak, R.; Gibbons, R.V.; Jarman, R.; Endy, T.P. Dengue plaque reduction neutralization test (PRNT) in primary and secondary dengue virus infections: How alterations in assay conditions impact performance. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2009**, *81*, 825–833. [\[CrossRef\]](#)
33. Gerth, H.J.; Grimshandl, D.; Stage, B.; Döller, G.; Kunz, C. Roe deer as sentinels for endemicity of tick-borne encephalitis virus. *Epidemiol. Infect.* **1995**, *115*, 355–365. [\[CrossRef\]](#)
34. Janko, C.; Trappmann, D.; Schröder, W.; Linke, S.; König, A. Freising Populationsdichten des Rotfuchses (*Vulpes vulpes*) im Stadt-Land-Gradienten und deren Determinanten. *Beitr. Jagd. Wildforsch.* **2013**, *38*, 89–94.
35. Labhardt, F. *Der Rotfuchs. Naturgeschichte, Ökologie und Verhalten Dieses Erstaunlichen Jagdwildes*; Parey: Hamburg/Berlin, Germany, 1990; ISBN 3-490-33812-X.
36. Arnold, J.M.; Greiser, G.; Krüger, S.; Martin, I. Status und Entwicklung ausgewählter Wildtierarten in Deutschland: Jahresbericht 2015. In *Wildtier-Informationssystem der Länder Deutschlands (WILD)*; Deutscher Jagdverband: Berlin, Germany, 2016.
37. Ernek, E.; Skoda, R. Experimental pathogenicity of tick-borne encephalitisvirus for golden hamsters (*Mesocricetus auratus* Waterhouse 1839) and foxes (*Vulpes vulpes*, Linné 1758). *Vet. Cas.* **1958**, *4*, 334.
38. Radda, A.; Hoffmann, H.; Kunz, C. Viremia in some European carnivores after infection with tick-borne encephalitis (TBE) virus by ticks. *Zbl. Bakt. I. Orig.* **1969**, *209*, 464–469.
39. Lorusso, V.; Lia, R.P.; Dantas-Torres, F.; Mallia, E.; Ravagnan, S.; Capelli, G.; Otranto, D. Ixodid ticks of road-killed wildlife species in southern Italy: New tick-host associations and locality records. *Exp. Appl. Acarol.* **2011**, *55*, 293–300. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Sobrino, R.; Millán, J.; Oleaga, A.; Gortázar, C.; de La Fuente, J.; Ruiz-Fons, F. Ecological preferences of exophilic and endophilic ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing wild carnivores in the Iberian Peninsula. *Vet. Parasitol.* **2012**, *184*, 248–257. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Meyer-Kayser, E.; Hoffmann, L.; Silaghi, C.; Passos, L.M.F.; Mahling, M.; Pfister, K. Tick infestation of foxes in Thuringia with special focus on foxes with scabies. *Vet. Med. Austria* **2011**, *98*, 292–296.
42. Sándor, A.D.; D’Amico, G.; Gherman, C.M.; Dumitrache, M.O.; Domşa, C.; Mihalca, A.D. Mesocarnivores and macroparasites: Altitude and land use predict the ticks occurring on red foxes (*Vulpes vulpes*). *Parasites Vectors* **2017**, *10*, 173. [\[CrossRef\]](#)
43. Karbowiak, G.; Stanko, M.; Miterpaková, M.; Humíková, Z.; Vichová, B. Ticks (Acari: Ixodidae) Ticks Parasitizing Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Slovakia and New Data About Subgenus Pholeoixodes Occurrence. *Acta Parasitol.* **2020**, *65*, 636–643. [\[CrossRef\]](#)
44. Chitimia-Dobler, L.; Mackenstedt, U.; Petney, T.N. Transmission/Natural cycle. In *The TBE Book*; Dobler, G., Erber, W., Schmitt, H.-J., Eds.; Global Health Press Pte Ltd.: Singapore, 2018; pp. 41–57, ISBN 978-981-11-1903-3.
45. Jemeršić, L.; Deždek, D.; Brnić, D.; Prpić, J.; Janicki, Z.; Keros, T.; Roić, B.; Slavica, A.; Terzić, S.; Konjević, D.; et al. Detection and genetic characterization of tick-borne encephalitis virus (TBEV) derived from ticks removed from red foxes (*Vulpes vulpes*) and isolated from spleen samples of red deer (*Cervus elaphus*) in Croatia. *Ticks Tick Borne Dis.* **2014**, *5*, 7–13. [\[CrossRef\]](#)

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Rotfuchs als Wirtsorganismus für subkutane Zecken und als Sentinel für das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSME-Virus) zu untersuchen. Der Rotfuchs bevorzugt strukturreiche Lebensräume, in denen sich Felder, Wiesen, Wälder und Gewässer abwechseln. Dadurch ist der Fuchs potentiellen Vektoren, wie z. B. Zecken, Flöhen und Stechmücken, verschiedener Infektionskrankheiten ausgesetzt. Diese können während der Blutmahlzeit Pathogene auf den Fuchs übertragen. Besonders hervorzuheben sind Zecken und Zecken-übertragbare Krankheitserreger. Einige dieser Erreger, beispielsweise das FSME-Virus, verursachen Zoonosen, die beim Menschen und beim Tier teilweise schwere Krankheitsbilder hervorrufen können.

In dieser Studie wurden erstmals gezielt 126 Füchse aus Deutschland auf das Vorkommen von subkutanen Zecken untersucht. Die ermittelte Prävalenz der subkutanen Zecken ist mit 88,1 % ($n = 111/126$) deutlich höher als in Polen (38 %) (DWUŻNIK 2019) und Tschechien/Rumänien (15,4 %) (D'AMICO et al. 2017). In unserer Studie wurden ausschließlich adulte Füchse auf subkutane Zecken untersucht. Bei der Arbeit aus Polen wurden sowohl adulte als auch juvenile Füchse in die Untersuchungen miteingeschlossen. Die Studie aus Tschechien/Rumänien macht keine genauen Angaben zu dem Alter der Füchse. Deshalb lässt sich derzeit keine Aussage über eine mögliche Korrelation zwischen dem Alter der Füchse und der Prävalenz subkutaner Zecken treffen.

Setzt man die ermittelte Prävalenz subkutaner Zecken in Höhe von 88,1 % in Kontext mit der Befallsintensität von externen Zecken auf Füchsen, so sieht man innerhalb von Europa deutliche Unterschiede. In Italien (7,4 %) (LORUSSO et al. 2011) und Rumänien (53,9 %) (SÁNDOR et al. 2017) ist die Befallsintensität deutlich geringer, während sie mit Studien aus Spanien (51,1-84,6 %) (SOBRINO et al. 2012; DOMÍNGUEZ 2004; DOMÍNGUEZ-PENAFIEL et al. 2011) und Deutschland (76,5-82,6 %) (MEYER-KAYSER et al. 2011; MEYER-KAYSER et al. 2012) übereinstimmt. Insgesamt lassen sich die Ergebnisse dieser Studien schwer miteinander vergleichen, da sie in Methodik, Anzahl der untersuchten Tiere und Zielsetzung stark differieren.

Es wird jedoch deutlich, dass bei Füchsen aus Deutschland durchweg hohe Prävalenzen externer Zecken ermittelt wurden. Im direkten Vergleich mit einer Studie aus Deutschland, die 1268 Füchse auf externe Zecken untersuchte, zeigen sich weitere Gemeinsamkeiten (MEYER-KAYSER et al. 2012). Beispielsweise waren in dieser Studie, wie auch in unserer, der Großteil der Füchse mit maximal 5 Zecken infestiert (50,9 % externe Zecken vs. 43,2 % subkutane Zecken). Bei einigen Füchsen konnten jedoch über 50 Zecken pro Fuchs von der Haut bzw. aus

dem subkutanen Gewebe gesammelt werden (5,7 % externe Zecken vs. 3,6 % subkutane Zecken). Aufgrund der vergleichbaren Verteilung sind die Durchschnittswerte der Zeckenanzahl pro Fuchs bei externen wie auch subkutanen Zecken ähnlich (11,7 externe Zecken/Fuchs vs. 10,8 subkutane Zecken/Fuchs).

Insgesamt wurden 1203 Zecken aus dem subkutanen Gewebe der Füchse präpariert. Alle Zecken konnten anhand von spezifischen morphologischen Charakteristika, wie dem dorsal gelegenen Schild und den anterior sichtbaren Mundwerkzeugen, der Familie Ixodidae zugeordnet werden. Die gut erhaltenen Zecken (25 %) konnten morphologisch bis auf Spezieslevel identifiziert werden. Die vorherrschende Zeckenspezies war *I. ricinus*, jedoch wurden auch *I. canisuga* und *I. hexagonus* im subkutanen Gewebe gefunden. Diese drei Zeckenspezies sind typische Vertreter der Zeckenfauna von in Deutschland lebenden Füchsen. In Arbeiten aus Rumänien/Tschechien (D'AMICO et al. 2017) und den USA (SMITH et al. 1986) wurden ebenfalls ausschließlich Zeckenspezies der regional typischen Zeckenfauna des Fuchses detektiert. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass es sich nicht um außergewöhnliche Zeckenarten handelt, sondern um Zecken, die typischerweise auf dem Fuchs, aber auch auf anderen Haus- und Wildtieren parasitieren.

Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob auch andere Tierarten betroffen sein können. Bisher wurde die Präsenz subkutaner Zecken hauptsächlich beim Rotfuchs beschrieben. Es existieren einzelne Fallberichte, die subkutane Zecken jedoch auch bei Marderhunden (MATYSIAK et al. 2018), bei einem Hund (ZAKRISSON 2010) und bei einem Kind (CHANG et al. 2006) beschreiben. In einer umfassenden Studie wurden 126 Rehdecken von außen und innen auf Zecken untersucht (KRÓL et al. 2020). Insgesamt wurden 1279 Zecken abgesammelt, allerdings war keine dieser Zecken im subkutanen Gewebe. Bisher ist sehr wenig zu diesem Phänomen bekannt und es bleibt die Frage offen, welche weiteren Tierarten davon betroffen sein können.

Auffällig ist, dass unabhängig von der Tierart hauptsächlich longirostrale Zecken subkutan zu finden sind. Longirostra (z. B. *Ixodes*, *Amblyomma*, *Hyalomma*) besitzen im Vergleich zu Brevirostra (z. B. *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus*) sehr lange Mundwerkzeuge und graben sich in tiefere Hautschichten ein (SLOVÁK et al. 2014; KLOMPEN 2005). In unserer Studie wurden ausschließlich *Ixodes*-Zecken identifiziert. Das tiefe Einbetten der Longirostra scheint die subkutane Lage der Zecken zu begünstigen.

Interessanterweise wurden hauptsächlich (99 %) adulte Zecken in der subkutanen Lokalisation gefunden, obwohl der Fuchs normalerweise extensiv mit Nymphen und teilweise auch Larven befallen ist. Juvenile Zecken besitzen ein kürzeres Hypostom als die adulten Zecken derselben

Spezies. Die Abwesenheit juveniler Stadien bestärkt die Annahme, dass die Länge des Hypostoms maßgebend für die subkutane Lage ist.

D'AMICO et al. (2017) stellten die Hypothese auf, dass eine lange Saugdauer der Zecken entscheidend für die subkutane Lokalisation ist. In Übereinstimmung mit dieser Annahme wurden in unserer Arbeit signifikant mehr weibliche Zecken gefunden als Männchen, Nymphen oder Larven. Weibchen haben die längste Saugperiode von 6-11 Tagen, während juvenile Zeckenstadien nur 2-6 Tage saugen (GERN 2009). Männliche *I. ricinus* Zecken befinden sich hauptsächlich für die Paarung mit einem Weibchen auf dem Wirtsorganismus. Dabei saugen sie fakultativ für kurze Zeit kleine Blutmahlzeiten (OLIVER 1989).

Das fakultative Saugen kann eine Erklärung dafür sein, warum 2 männliche *I. ricinus* einzeln im subkutanen Gewebe zu finden waren. Allerdings wurden 6 der insgesamt 8 Männchen in Kopulation mit dem Weibchen aus dem Gewebe präpariert. Die Paarung mit dem Weibchen kann bis zu 11 Tage andauern, während das Weibchen die Blutmahlzeit zu sich nimmt (KOCAN et al. 2015). Wahrscheinlich haben die Paare aus Weibchen und Männchen gemeinsam die Haut der Füchse durchdrungen. Die Tatsache, dass hauptsächlich Männchen in Paarung subkutan gefunden wurden, bestätigt die Vermutung, dass eine lange Saugperiode ausschlaggebend für die subkutane Lokalisation der Zecken ist. Zusätzlich ist nicht auszuschließen, dass die 2 einzelnen Männchen während des Abbauprozesses oder der Präparation von dem Weibchen getrennt wurden.

In dieser Arbeit wurden signifikant die meisten Zecken in den folgenden drei Körperregionen lokalisiert: Ohr, Inguinal- und Axillarregion. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Studien überein. SMITH et al. (1986) berichteten über Zecken in der Inguinal-, Axillar- und Perianalregion, während DROZDZ (1958) subkutane Zecken im Bereich des Rückens, des Bauches und der Ohren fand. Allerdings enthält keine dieser Studien Informationen über die Häufigkeit der Zecken in der jeweiligen Körperregion. In dieser Arbeit wurde erstmals die Lokalisation jeder Zecke dokumentiert und einer von 10 definierten Körperregionen zugeordnet. In der Inguinalregion wurden signifikant die meisten Zecken, im Vergleich mit allen anderen Körperregionen, gefunden. Bei 91 der 111 betroffenen Füchse konnten dort subkutane Zecken lokalisiert werden. Die zweit- und dritthäufigste betroffene Körperregion war der Bereich um die Ohren und der Axillar. Insgesamt wurden in den drei am häufigsten betroffenen Körperregionen über 80 % der Zecken gefunden. Auffallend ist, dass die drei bevorzugten Regionen weniger behaart sind und die Haut an diesen Stellen in Falten liegt und dünn ist. Ähnliche Präferenzen für den Zeckenstich konnten bei Hunden und Katzen festgestellt werden (ESCCAP 2018). Für den Rotfuchs gibt es bislang keine Studien, die die bevorzugten

Körperstellen für das Anheften der Zecken an der äußeren Haut beschreiben. Wir vermuten jedoch, dass die Wahl der Körperregion nicht das Ziel der subkutanen Lokalisation hat. Zumal dieses Phänomen keinen evolutionären Vorteil für die Zecke darstellt, denn der Lebenszyklus kann nicht abgeschlossen werden. Alle Zecken, die im subkutanen Gewebe gefunden wurden, waren tot und zum Teil so stark abgebaut, dass nur noch Bruchstücke des Exoskeletts erkennbar waren.

Aufgrund des fortgeschrittenen Abbauprozesses ist eine Speziesidentifizierung anhand von morphologischen Kriterien nur begrenzt möglich, wie vorherige Arbeiten zeigten (D'AMICO et al. 2017). In der vorliegenden Arbeit konnten 75 % der Zecken nur bis auf Gattungsebene bestimmt werden. Deshalb war das Ziel dieser Studie, diese Zecken genetisch mittels konventioneller PCR zu untersuchen. Für die Gensequenzierung wurde das 16S rRNA Gen und das *cox1* Gen ausgewählt (LV et al. 2013; HORNOK et al. 2017). Für die DNA-Aufreinigung und für die PCR wurden etablierte und standardisierte Protokolle verwendet, dennoch war die DNA-Isolation der Zecken nicht erfolgreich. Weitere Fehlerquellen, wie beispielsweise die Lagerung der Zecken, konnten ausgeschlossen werden. Das Problem scheinen die Zecken selbst zu sein, die stark degeneriert und abgebaut sind.

Für eine nähere Untersuchung des Abbauprozesses und der Entzündungsreaktion in der Haut des Fuchses führten wir eine pathohistologische Untersuchung der Zecken und des umliegenden Gewebes durch. Diese Untersuchungen ergaben, dass der Grad der Entzündungsreaktion des Fuchses von dem Abbaustadium der Zecke abhängt. Bei allen Stadien konnte eine granulomatöse Panniculitis festgestellt werden, deren Schwere mit dem Abbauprozess der Zecke zunimmt. Lediglich eine Zecke konnte gefunden werden, die nahezu vollständig intakt war. In dem Gewebeschnitt konnte eine akute lokale mechanische Reizung von Dermis und Epidermis entdeckt werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass diese Zecke kurz vor dem Tod des Fuchses in die Haut eingedrungen war. Allerdings waren sowohl bei dieser Zecke, als auch bei den Zecken im fortgeschrittenen Abbaustadium im Inneren der Zecke keine Organstrukturen und Zellen erkennbar. Dies könnte erklären, warum eine DNA-Isolierung nicht erfolgreich war.

Die Mechanismen rund um den Abbau der Zecken im subkutanen Gewebe sind weiterhin unklar. Interessant für weitergehende Untersuchungen ist die Frage, ob bei der Zersetzung Pathogene der Zecke auf den Fuchs übertragen werden.

Für die Übertragung des FSME-Virus spielt die subkutane Lage und Zersetzung der Zecke mutmaßlich nur eine untergeordnete Rolle. Denn das Virus persistiert in den Speicheldrüsen der Zecke und wird mit dem Stich sofort auf den Wirt übertragen (ŠIMO et al. 2017). FSME

ist eine zoonotische Erkrankung, die beim Menschen zu einem schweren bis lebensbedrohlichen Krankheitsverlauf führen kann. Da die derzeitige Risikobewertung in Deutschland mittels humaner Fallzahlen immer weiter in Kritik gerät (DOBLER et al. 2012), ist die Suche nach einem geeigneten Sentinel in den Fokus gerückt (IMHOFF et al. 2015). Nach GERTH et al. (1995) sollte das ideale Sentinel für FSME folgende vier Bedingungen erfüllen. Es sollte:

- einen limitierten Bewegungsradius haben
- in großer Zahl vorhanden sein
- im Untersuchungsgebiet gut verteilt sein
- eine langlebige Antikörperpräsenz nach natürlicher Infektion aufweisen

Der Lebensraum und damit auch der Bewegungsradius des Rotfuchses ist abhängig von der Verfügbarkeit von Nahrungsressourcen und der Habitatsstruktur. In Deutschland bewegen sich ländlich lebende Füchse in einem 2 km² Radius, während Stadtfüchse in einem kleineren Radius von 0,5 km² leben (JANKO et al. 2012). Aufgrund der enormen Anpassungsfähigkeit und dem Wegfall von Fressfeinden ist der Rotfuchs überall in Deutschland in großer Zahl verbreitet (ARNOLD et al. 2016). Die Dauer der Antikörperpräsenz ist derzeit unbekannt. Allerdings zeigt der Rotfuchs nach experimenteller Infektion *via* infizierter Zecken oder Virusinjektion klassische Symptome einer FSME-Erkrankung. Zusätzlich konnten eine Virämie und hohe Antikörpertiter gegen das FSME-Virus nachgewiesen werden (ERNEK et al. 1958; RADDA et al. 1969).

Außerdem sollte das ideale Sentinel Zeckenspezies exponiert sein, die bekannte FSME-Vektoren sind (IMHOFF et al. 2015). In Europa parasitieren mehrere Spezies der Gattung *Ixodes*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma* und *Rhipicephalus* auf dem Rotfuchs (KARBOWIAK et al. 2020; LORUSSO et al. 2011; SÁNDOR et al. 2017; SOBRINO et al. 2012). Drei dieser Spezies, *I. ricinus*, *D. reticulatus* und *H. concinna*, sind Vektoren für das FSME-Virus (KOZUCH et al. 1971; RIZZOLI et al. 2014; KOZUCH et al. 1980). Zusätzlich konnte das Virus aus *I. hexagonus*, *I. canisuga*, *H. punctata* und *I. trianguliceps* isoliert werden, typische Vertreter der Zeckenfauna des Fuchses in Europa (RADDA 1973; NOWAK-CHMURA et al. 2012).

Zusammenfassend erfüllt der Rotfuchs alle Anforderungen, um als ideales Sentinel für das FSME-Virus zu fungieren. Derzeit existieren allerdings keine publizierten Daten über die Sensitivität und Spezifität von kommerziell erhältlichen Screening-Methoden für die Antikörper-Detektion beim Fuchs. Deswegen wurde der Seroprävalenz-Studie ein Methodenvergleich vorangestellt.

In Zusammenarbeit mit dem FSME-Konsiliarlabor unter der Leitung von Prof. Dobler wurde ein kommerziell erhältliches ELISA Kit (Immunozyt FSME IgG All Species ELISA, Progen, Heidelberg, Deutschland) und ein kommerziell erhältlicher IFT (Euroimmun Anti-TBEV-IIFT, Euroimmun AG, Lübeck, Deutschland) verglichen mit einem selbst entwickelten Mikro-NT als Goldstandard. Nach 192 getesteten Proben mit allen 3 Testsystemen wurde eine weitere Testung durch den IFT abgebrochen, da die Spezifität des IFT deutlich niedriger war als die des ELISA. Die Sensitivität von ELISA und IFT waren bei diesem Zwischenstand vergleichsweise hoch, da überwiegend positive Proben getestet wurden. Nachdem alle 1233 Serumproben im ELISA und NT getestet wurden, ergab sich für den ELISA eine Sensitivität von 42,31 % und eine Spezifität von 98,87 %. KLAUS et al. (2012) verwendeten ELISA Kits derselben Firma und ermittelten ähnliche Werte für die Spezifität und die Sensitivität für die Antikörper-Detektion in Ziegenseren. Der ELISA ist eine zuverlässige Methode für die Diagnostik nach einer akuten FSME-Infektion (DOBLER 2018). Allerdings scheint die Anzahl von falsch-negativen Ergebnissen zu steigen, wenn der Antikörpertiter in der Probe niedrig ist, z. B. durch eine lang zurückliegende Infektion oder durch die Verdünnung der Serumprobe (Manuskript in Vorbereitung). Deswegen ist ein Screening *via* ELISA oder IFT und eine anschließende Bestätigung der positiven Proben mittels NT für epidemiologische Fragestellungen nicht sinnvoll. Es stellt sich daher die Frage, ob für epidemiologische Untersuchungen nur ein NT durchgeführt werden sollte.

Der NT ist das Testsystem mit der höchsten Spezifität und Sensitivität für die FSME-Antikörper-Diagnostik und basiert auf der Fähigkeit, von Antikörpern lebende Viren zu neutralisieren (LITZBA et al. 2014; KLAUS et al. 2011). Dadurch werden ausschließlich die Proben als positiv gewertet, die biologisch aktive und neutralisierende Antikörper gegen das FSME-Virus enthalten. Ein weiterer Vorteil ist, dass der NT Spezies-unabhängig funktioniert. Deswegen kann der von uns entwickelte Mikro-NT für die Testung von FSME-spezifischen Antikörpern jeglicher Tierarten verwendet werden. Die größten Nachteile des NT sind jedoch, dass ein BSL3 Labor für die FSME-Virus Kultivierung benötigt wird und das Testergebnis erst nach 5-7 Tagen abgelesen werden kann. Da für epidemiologische Fragestellungen Zeit kein kritischer Faktor ist, kann dieser Nachteil des NT vernachlässigt werden.

Eine große Schwierigkeit bei der Testung von Wildtier-Serumproben ist die oft nicht hinreichende Qualität (IMHOFF et al. 2015; BALLING et al. 2014). Aufgrund der Hämolyse und der starken Verunreinigung während der Probenentnahme ist eine Auswertung durch einen NT zum Teil nicht möglich. Die Hämolyse und die Verunreinigungen wirken zelltoxisch, sodass die Zellen bei der Zugabe der Probe absterben (BALLING et al. 2014). Wir haben die

Proben zentrifugiert und für 30 min bei 56°C inaktiviert für die Elimination von Verunreinigung, möglichen Pathogenen und des Komplementsystems (ROEHRIG et al. 2008; THOMAS et al. 2009). Durch diese Vorbereitung der Proben war es uns möglich, alle 1233 Serumproben im Mikro-NT zu testen. Es muss außerdem berücksichtigt werden, dass die Serumproben schon bei der Entnahme verdünnt wurden. Eine qualitative Untersuchung des Antikörpertiters ist demzufolge für dieses Studiendesign nicht sinnvoll.

Zusammenfassend ist mit entsprechender Vorbereitung der Proben der von uns entwickelte Mikro-NT eine vielversprechende Methode für die FSME Antikörper-Detektion beim Rotfuchs. Insgesamt wurden in unserer Studie 1233 Rotfüchse aus allen Teilen Deutschlands serologisch untersucht. Bei 260 (21,1 %) Serumproben wurden neutralisierende Antikörper nachgewiesen. Die ermittelten Seroprävalenzen gegen FSME-spezifische Antikörper auf Landkreis-Ebene reflektieren die Infektionsrate in Deutschland und weisen signifikante Unterschiede zwischen den Risikogebieten (30,5 %; $n = 173/568$) und Nicht-Risikogebieten (13,1 %; $n = 87/665$) auf. Besonders interessant sind die 87 positiv getesteten Füchse aus den Nicht-Risikogebieten. Diese stammen aus einem Landkreis in Brandenburg, zwei Landkreisen in Hessen und Sachsen, vier Landkreisen jeweils in Rheinland-Pfalz, Sachsen-Anhalt und Schleswig-Holstein, fünf Landkreisen in Thüringen, zehn Landkreisen in Niedersachsen und sechzehn in Nordrhein-Westfalen. Die meisten dieser Landkreise werden nur durch eine geringe Probenanzahl repräsentiert, sodass ein Vergleich der Prävalenzen nicht sinnvoll ist. Dennoch demonstrieren diese Beispiele die Möglichkeit, durch Seroprävalenzstudien beim Fuchs neue FSME-Herde in Nicht-Risikogebieten aufzudecken. Infolge unserer Ergebnisse ist es notwendig, in diesen Gebieten nach FSME-positiven Zecken für die Detektion des genauen Standortes der FSME-Naturherde zu suchen.

Nach unserem Wissenstand sind wir die ersten, die derartig hohe Prävalenzen von NT-verifizierten FSMEV-spezifischen Antikörper beim Rotfuchs in FSME Risiko- wie auch in Nicht-Risikogebieten nachweisen konnten. In älteren Studien aus Deutschland und den Niederlanden wurden vor allem Füchse aus Nicht-Risikogebieten getestet und es wurden keine Antikörper bzw. nur bei einem Fuchs Antikörper gefunden (VAN DER POEL et al. 2005; WURM et al. 2000). Bisher wurden nur zwei Studien in FSME Risikogebieten durchgeführt. In einer Studie aus Deutschland wurden Seroprävalenzen bis zu 34,2 % ermittelt, allerdings wurden diese Ergebnisse nicht mittels NT bestätigt (RIEGER et al. 1999). Somit können mögliche Kreuzreaktionen mit anderen Flaviviren oder unspezifische Bindungen nicht ausgeschlossen werden (DOBLER et al. 1996). Für die Studie von RADDA et al. (1968), die

bei 10 von 26 untersuchten Füchsen in Niederösterreich Antikörper nachweisen konnten, gilt ähnliches.

Zwischen der humanen FSME-Inzidenz und der Seroprävalenz von Füchsen aus FSME-Risikogebieten konnte eine signifikante positive Korrelation festgestellt werden. Diese positive Korrelation zeigt, dass die Seroprävalenz in Füchsen die humanen Fallzahlen widerspiegelt. Unsere Ergebnisse stimmen mit einer Studie aus Schweden überein, in der eine positive Korrelation zwischen der Fuchspopulation und der humanen FSME-Inzidenz gefunden wurde (HAEMIG et al. 2008). Sie widersprechen jedoch den Ergebnissen einer Studie aus Deutschland, die den gegenteiligen Effekt beschrieben hat (KIFFNER et al. 2010).

Die Seroprävalenzen von Füchsen aus Nicht-Risikogebieten hingegen stehen jedoch nicht in einem Zusammenhang mit der humanen FSME-Inzidenz. Wir fanden Seroprävalenzen von bis zu 33,3 % in Landkreisen mit einer Inzidenz von 0,0 % (Stadtkreis Gelsenkirchen, Minden-Lübbecke, Nordfriesland). In keinem dieser Landkreise wurden bisher FSME-Fälle beim Menschen gemeldet. Es besteht Untersuchungsbedarf, ob diese Diskrepanzen auf niedrig pathogene FSMEV-Stämme zurückzuführen sind, die eine Infektion des Menschen mit einem inapparenten klinischen Verlauf verursachen (RUZEK et al. 2019). Da jedoch jedes Jahr autochthone Fälle von FSME beim Menschen außerhalb der definierten Risikobereiche gemeldet werden, nehmen wir an, dass dies auf unentdeckte FSME-Naturherde zurückzuführen ist. Die Untersuchung von Fuchs-Seroprävalenzen könnte helfen, solche FSME-Herde zu lokalisieren. Wir schließen daraus, dass der Rotfuchs ein geeigneter prädiktiver Sentinel ist und die Seroprävalenz in Füchsen die Inzidenz-basierte Risikobewertung ergänzen kann.

5. Zusammenfassung

Maja Haut

Der Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) als Wirt für subkutane Zecken und als Sentinel für das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus in Deutschland

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

Eingereicht 11/2020

53 Seiten, 3 Abbildungen, 1 Tabelle, 2 Publikationen, 141 Literaturangaben

Schlüsselwörter: Rotfuchs, *Vulpes vulpes*, *Ixodes ricinus*, subkutan, Ixodidae, Sentinel, Frühsommer-Meningoenzephalitis, FSME, Europa

Einleitung

Rotfüchse bevorzugen strukturreiche Lebensräume, in denen sich Wald, Wiesen und Gewässer abwechseln. Dadurch sind sie verschiedenen Vektoren und Krankheitserregern ausgesetzt. Zu diesen Vektoren gehören unter anderem Zecken, die während der Blutmahlzeit verschiedene Pathogene, wie beispielsweise das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSME-Virus), auf den Fuchs übertragen können. Die Zecken sind während des Saugaktes fest in der äußeren Haut des Wirtes verankert. Erstaunlicherweise findet man bei Füchsen Zecken im subkutanen Gewebe.

Ziele der Untersuchung

Die Ziele dieser Arbeit sind Füchse aus Deutschland erstmals gezielt auf subkutane Zecken zu untersuchen, die Zeckenspezies anhand von morphologischen und genetischen Merkmalen zu bestimmen, sowie die Gewebereaktion des Fuchses zu analysieren. Zusätzlich soll eine Seroprävalenzstudie in bekannten FSME Risiko- und Nicht-Risikogebieten durchgeführt werden, um die Rolle des Fuchses im natürlichen FSME-Übertragungszyklus zu beleuchten. Der Seroprävalenzstudie soll ein Methodenvergleich von serologischen Nachweismethoden von Antikörpern gegen das FSME-Virus vorangestellt werden, da derzeit keine Daten zu Sensitivität und Spezifität für die Diagnostik beim Rotfuchs bekannt sind.

Tiere, Material und Methoden

Es wurden 126 Fuchsfelle aus verschiedenen Teilen Deutschlands untersucht und die subkutanen Zecken aus dem Gewebe präpariert. Die genaue Lokalisation jeder Zecke wurde dokumentiert, anschließend wurden die Zecken anhand von standardisierten Protokollen

morphologisch bestimmt. Stark zersetzte Zecken sollten unter Verwendung der PCR Amplifikation des 16S rRNA-Gens und des *cox1*-Gens identifiziert werden. Die genaue Lokalisation der Zecken in der Haut wurde statistisch ausgewertet und in einer Schemazeichnung dargestellt. Die Hematoxylin- und Eosin-Färbung wurde verwendet für die histopathologische Untersuchung der Gewebereaktion der Füchse. Für die Seroprävalenzstudie wurde ein kommerziell erhältlicher ELISA und IFT miteinander verglichen und die Sensitivität und Spezifität ermittelt. Die Verifizierung erfolgte durch einen neu entwickelten Mikro-Neutralisationstest. Insgesamt wurden 1233 Füchse aus FSME Risiko- und Nicht-Risikogebieten serologisch untersucht. Für die statistische Auswertung beider Studien wurden folgende Tests angewandt: Mann-Whitney-U-Test, Fisher's exact test, Chi-Quadrat Streuungstest, Rangkorrelation nach Spearman, Korrelation nach Bravais-Pearson.

Ergebnisse

Bei 111 der 126 (88,1 %) Fuchsfellen wurden mindestens 1 bis maximal 79 Zecken aus dem subkutanen Gewebe präpariert. Die insgesamt 1203 Zecken konnten alle der Gattung *Ixodes* zugeordnet werden. Von diesen konnten 301 Zecken bis auf Spezieslevel identifiziert werden: *Ixodes ricinus* (Weibchen, $n = 289$; Männchen, $n = 8$; Nymphe, $n = 1$), *I. hexagonus* (Weibchen, $n = 2$), *I. canisuga* (Weibchen, $n = 1$). Die drei prädominanten Körperregionen für die subkutane Zeckenlokalisation waren Ohr, Inguinal- und Axillarregion. In der pathohistologischen Untersuchung zeigte sich eine granulomatöse Panniculitis, deren Schwere mit zunehmender Zersetzung der Zecken zunahm. Für den epidemiologischen Nachweis von FSME-spezifischen Antikörpern eignete sich der von uns entwickelte Mikro-NT. Die Spezifität des IFT (62,3 %) und die Sensitivität des ELISA (42,3 %) waren unzureichend. Die Gesamtprävalenz von FSME-spezifischen Antikörpern bei Füchsen in Deutschland lag bei 21,1 % ($n = 260/1233$), wobei signifikante Unterschiede zwischen den Risikogebieten (30,5 %) und Nicht-Risikogebieten (13,1 %) bestehen. In den Risikogebieten konnte eine positive Korrelation zwischen der humanen FSME-Inzidenz und der Seroprävalenz der Füchse ermittelt werden. In Nicht-Risikogebieten konnte keine Korrelation festgestellt werden. Dort waren bis zu 30 % der Füchse positiv, während die humane Inzidenz gegen null ging.

Schlussfolgerung

Die subkutane Lokalisation der Zecken scheint beim Fuchs eher die Regel als die Ausnahme zu sein. Das tiefe Eindringen longirostraler *Ixodes*-Zecken sowie die langen Saugzeiten der Weibchen scheinen die subkutane Lokalisation zu begünstigen. Der Rotfuchs ist als prädiktiver Sentinel für FSME geeignet und in der Lage unentdeckte FSME-Herde aufzudecken.

6. Summary

Maja Haut

The red fox (*Vulpes vulpes*) as host for subcutaneous ticks and sentinel for the Tick-borne encephalitis Virus in Germany

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

Submitted 11/2020

53 pages, 3 figures, 1 table, 2 publications, 141 references

Keywords: red fox, *Vulpes vulpes*, *Ixodes ricinus*, subcutaneous, Ixodidae, Sentinel, Tick-borne encephalitis Virus, TBE, Europe

Introduction

Red foxes prefer highly variegated landscapes where forest, grassland and water bodies alternate. Thus, they are exposed to different vectors and infectious diseases. These vectors include ticks, which can transmit various pathogens, such as the (Tick-borne encephalitis Virus) TBE virus, to the fox during the blood meal. Ticks are usually strongly attached to the external surface of their hosts to remain in place for a blood meal. Interestingly, in some cases ticks can also be found in the subcutaneous tissue of red foxes.

Objectives

The objectives of this study were to examine foxes from Germany for the first time specifically for subcutaneous ticks, to identify the tick species by morphological and genetic characteristics and to analyze the tissue reaction of the fox. In addition, we compared different serological methods for TBEV antibody detection in red foxes, because no data exists about sensitivity and specificity. Subsequently we performed a seroprevalence study in known TBE risk and non-risk areas to shed light into the role of the fox in the natural transmission cycle of TBEV.

Material and Methods

The visceral side of 126 red fox furs from Germany was examined visually searching for ticks. The localization of ticks was recorded and assigned to ten specific body parts. Morphological identification of ticks was performed according to standardized taxonomic protocols. Ticks which could not be further identified were examined genetically *via* conventional PCR targeting the 16S rRNA and *cox1* gene. Hematoxylin and eosin (H&E) staining was used for histopathological examination. For the seroprevalence study a commercially available ELISA

Summary

and IFA were compared and sensitivity and specificity was determined. The verification was performed by a newly developed micro neutralization test. A total of 1233 foxes from TBE risk and non-risk areas were serologically examined. The following tests were used for the statistical analysis of both studies: Mann-Whitney-U-Test, Fisher's exact test, chi-square test, Pearson's correlation coefficient, Spearman's rank correlation.

Results

In 111 of the 126 (88.1 %) examined foxes, at least 1 to a maximum of 79 ticks were prepared from the subcutaneous tissue. The altogether 1203 ticks could all be assigned to the genus *Ixodes*. Out of these 301 ticks could be identified down to species level: *Ixodes ricinus* (female, n = 289; male, n = 8; nymph, n = 1), *I. hexagonus* (female, n = 2), *I. canisuga* (female, n = 1). The three predominant body regions for subcutaneous tick localization were the ear, inguinal and axillary regions. The pathohistological examination revealed a granulomatous panniculitis, the severity increases with the tick decomposition progresses. For the epidemiological detection of TBEV-specific antibodies the micro-NT was most suitable. The specificity of the IFT (62.3 %) and the sensitivity of the ELISA (42.3 %) were insufficient. The overall prevalence of TBEV-specific antibodies in foxes in Germany was 21.1 % (n = 260/1233), with significant differences between risk areas (30.5 %) and non-risk areas (13.1 %). In the risk areas, a positive correlation between human TBE incidence and seroprevalence in foxes was found. In non-risk areas no correlation could be found. There, up to 30 % of foxes were positive, while the human incidence was close to zero.

Conclusion

The subcutaneous localization of ticks seems to be the rule rather than the exception in red foxes. The deep penetration of longirostral *Ixodes*-ticks, as well as the long feeding times of the females seem to favor the subcutaneous localization. The red fox is suitable as a predictive sentinel for TBE and is able to detect undiscovered TBE foci.

7. Referenzen

7.1 Literatur

Achazi K, Růžek D, Donoso-Mantke O, Schlegel M, Ali H, Wenk M, Schmidt-Chanasit J, Ohlmeyer L, Rühle F, Vor T, Kiffner C, Kallies R, Ulrich R, Niedrig M. Rodents as sentinels for the prevalence of tick-borne encephalitis virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011;11:641–7.

Adkins C, Stott P. Home ranges, movements and habitat associations of red foxes *Vulpes vulpes* in suburban Toronto, Ontario, Canada. *J Zoology.* 1998;244:335–46.

Alekseev A. Ecology of tick-borne encephalitis virus: part of Ixodidae ticks males in its circulation. *Ecol Parasitol.* 1991;1:51–62.

Arnold JM, Greiser G, Krüger S, Martin I. Status und Entwicklung ausgewählter Wildtierarten in Deutschland. Jahresbericht 2015. Wildtier-Informationssystem der Länder Deutschlands (WILD). Berlin; 2016.

Bakhvalova V, Potapova O, Panov V, Morozova O. Vertical transmission of tick-borne encephalitis virus between generations of adapted reservoir small rodents. *Virus Res.* 2009;140:172–8.

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

Balling A, Plessow U, Beer M, Pfeffer M. Prevalence of antibodies against tick-borne encephalitis virus in wild game from Saxony, Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5:805–9.

Balogh Z, Egyed L, Ferenczi E, Bán E, Szomor K, Takács M, Berencsi G. Experimental Infection of Goats with Tick-Borne Encephalitis Virus and the Possibilities to Prevent Virus Transmission by Raw Goat Milk. *Intervirology.* 2012;55:194–200.

Beck C, Jimenez-Clavero M, Leblond A, Durand B, Nowotny N, Leparc-Goffart I, Zientara S, Jourdain E, Lecollinet S. Flaviviruses in Europe: complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of West Nile disease. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10:6049–83.

Referenzen

Bestehorn M, Dobler G. Das FSME-Virus. In: Rubel F, Schiffner-Rohe J, Hrsg. FSME in Deutschland. Stand der Wissenschaft. 1. Aufl. Kappelrodeck; 2019. p. 11–23.

Brockmann S, Oehme R, Buckenmaier T, Beer M, Jeffery-Smith A, Spannenkrebs M, Haag-Milz S, Wagner-Wiening C, Schlegel C, Fritz J, Zange S, Bestehorn M, Lindau A, Hoffmann D, Tiberi S, Mackenstedt U, Dobler G. A cluster of two human cases of tick-borne encephalitis (TBE) transmitted by unpasteurised goat milk and cheese in Germany, May 2016. Euro Surveill. 2018;23.

Burt W. Territoriality and Home Range Concepts as Applied to Mammals. J Mammal. 1943;24:346–52.

Cardoso L, Gilad M, Cortes H, Nachum-Biala Y, Lopes A, Vila-Viçosa M, Simões M, Rodrigues P, Baneth G. First report of *Anaplasma platys* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) and molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* in foxes from Portugal. Parasit Vectors. 2015;8:144.

Cavallini P, Lovari S. Home range, habitat selection and activity of the red fox in a Mediterranean coastal ecotone. Acta Theriol. 1994;39:279–87.

Chang S, Park J-H, Kwak J, Joo M, Kim H, Chi J, Hong S-T, Chai J-Y. A case of histologically diagnosed tick infestation on the scalp of a Korean child. Korean J Parasitol. 2006;44:157–61.

Charrel R, Attoui H, Butenko A, Clegg J, Deubel V, Frolova T, Gould E, Gritsun T, Heinz F, Labuda M, Lashkevich V, Loktev V, Lundkvist A, Lvov D, Mandl C, Niedrig M, Papa A, Petrov V, Plyusnin A, Randolph S, Süss J, Zlobin V, Lamballerie X de. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. Clin Microbiol Infect. 2004;10:1040–55.

Chitimia-Dobler L, Lemhöfer G, Król N, Bestehorn M, Dobler G, Pfeffer M. Repeated isolation of tick-borne encephalitis virus from adult *Dermacentor reticulatus* ticks in an endemic area in Germany. Parasit Vectors. 2019;12:90.

Chitimia-Dobler L, Mackenstedt U, Petney T. Transmission / Natural cycle. In: Dobler G, Erber W, Schmitt HJ, Hrsg. The TBE book. Singapore; 2018. p. 41–57.

Cornely M, Schultz U. Zur Zeckenfauna Ostdeutschlands. Angew Parasitol. 1992;33:173–83.

Referenzen

- Dai X, Shang G, Lu S, Yang J, Xu J. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerg Microbes & Infect.* 2018;7:74.
- D'Amico G, Juránková J, Tăbăran F, Frgelecová L, Forejtek P, Matei I, Ionică A, Hodžić A, Modrý D, Mihalca A. Occurrence of ticks in the subcutaneous tissue of red foxes, *Vulpes vulpes* in Czech Republic and Romania. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2017;8:309–12.
- Danielová V, Holubová J, Pejcoch M, Daniel M. Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus. *Folia Parasitol.* 2002;49:323–5.
- Dekker J, Stein A, Heitkönig I. A spatial analysis of a population of red fox (*Vulpes vulpes*) in the Dutch coastal dune area. *J Zoology.* 2001;255:505–10.
- Deplazes P, Eckert J, Mathis A, von Samson-Himmelstjerna G, Zahner H. *Parasitology in Veterinary Medicine.* Wageningen; 2016.
- Deždek D, Vojta L, Curković S, Lipej Z, Mihaljević Z, Cvetnić Z, Beck R. Molecular detection of *Theileria annae* and *Hepatozoon canis* in foxes (*Vulpes vulpes*) in Croatia. *Vet Parasitol.* 2010;172:333–6.
- Dobler G. Diagnosis. In: Dobler G, Erber W, Schmitt HJ, Hrsg. *The TBE book.* Singapore; 2018. p. 276–82.
- Dobler G. Epidemiologie der FSME in Deutschland. In: Rubel F, Schiffner-Rohe HJ, Hrsg. *FSME in Deutschland. Stand der Wissenschaft.* 1. Aufl. Kappelrodeck; 2019 p. 115–29.
- Dobler G, Gniel D, Petermann R, Pfeffer M. Epidemiology and distribution of tick-borne encephalitis. *Wien Med Wochenschr.* 2012;162:230–8.
- Dobler G, Hufert T, Pfeffer M, Essbauer S. Tick-borne encephalitis: from microfocus to human disease. In: Mehlhorn H, Hrsg. *Parasitology Research Monographs 2. Progress in Parasitology.* Berlin, Heidelberg; 2011. p. 323–31.
- Dobler G, Treib J, Kiessig S, Blohn W, Frösner G, Haass A. Diagnosis of tick-borne encephalitis: evaluation of sera with borderline titers with the TBE-ELISA. *Infection.* 1996;24:405–6.
- Domínguez G. North Spain (Burgos) wild mammals ectoparasites. *Parasite.* 2004;11:267–72.

Referenzen

- Domínguez-Peñafiel G, Giménez-Pardo C, Gegúndez M, Lledó L. Prevalence of ectoparasitic arthropods on wild animals and cattle in the Las Merindades area (Burgos, Spain). *Parasite*. 2011;18:251–60.
- Drozdz J. Penetration of *Ixodes ricinus* under the skin of the host. *Acta Parasitol Pol*. 1958;6:383–5.
- Dwuźnik D. Ectoparasites of red fox *Vulpes vulpes* with peculiar focus on ticks in the subcutaneous tissues. *Ann Parasitol*. 2019;65:250.
- Ebani V, Verin R, Fratini F, Poli A, Cerri D. Molecular survey of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from central Italy. *J Wildl Dis*. 2011;47:699–703.
- Ecker M, Allison S, Meixner T, Heinz F. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J Gen Virol*. 1999;80:179–85.
- Ernek E, Skoda R. Experimental pathogenicity of tick-borne encephalitisvirus for golden hamsters (*Mesocricetus auratus* Waterhouse 1839) and foxes (*Vulpes vulpes*, Linné 1758). *Vet Cas*. 1958;4:334.
- ESCCAP, 2018. ESCCAP Guideline 03 Sixth Edition – March 2018 - Control of Ectoparasites in Dogs and Cats
https://www.esccap.org/uploads/docs/mjy50wev_0720_ESCCAP_Guideline_GL3_v9_1p.pdf
(17.11.2020).
- Frimmel S, Krienke A, Riebold D, Loebermann M, Littmann M, Fiedler K, Klaus C, Süss J, Reisinger E. Tick-borne encephalitis virus habitats in North East Germany: reemergence of TBEV in ticks after 15 years of inactivity. *Biomed Res Int*. 2014;2014:308371.
- Gäumann R, Mühlemann K, Strasser M, Beuret C. High-throughput procedure for tick surveys of tick-borne encephalitis virus and its application in a national surveillance study in Switzerland. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76:4241–9.
- Gern L. Life cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and transmission to humans. *Curr Probl Dermatol*. 2009;37:18–30.
- Gerrikagoitia X, Gil H, García-Esteban C, Anda P, Juste R, Barral M. Presence of *Bartonella* species in wild carnivores of northern Spain. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78:885–8.

Referenzen

- Gerth H, Grimshandl D, Stage B, Döller G, Kunz C. Roe deer as sentinels for endemicity of tick-borne encephalitis virus. *Epidemiol Infect.* 1995;115:355–65.
- Goretzki J, Paustian K-H. Zur Biologie des Rotfuchses, *Vulpes vulpes* (L., 1758), in einem intensiv landwirtschaftlich genutzten Gebiet. *Beitr Jagd Wildforsch.* 1982;12:96–107.
- Gritsun T, Lashkevich V, Gould E. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* 2003;57:129–46.
- Groen J, Koraka P, Nur Y, Avsic-Zupanc T, Goessens W, Ott A, Osterhaus A. Serologic evidence of ehrlichiosis among humans and wild animals in The Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002;21:46–9.
- Günther G, Haglund M. Tick-borne encephalopathies: epidemiology, diagnosis, treatment and prevention. *CNS drugs.* 2005;19:1009–32.
- Haemig P, Lithner S, Sjöstedt De Luna S, Lundkvist A, Waldenström J, Hansson L, Arneborn M, Olsen B. Red fox and tick-borne encephalitis (TBE) in humans: can predators influence public health? *Scand J Infect Dis.* 2008;40:527–32.
- Hauer, S., Ansorge, H., Zöphel, U. Atlas der Säugetiere Sachsens. Naturschutz und Landschaftspflege. Naturschutz und Landschaftspflege. Dresden; 2009.
- Heidrich, J. Untersuchungen zur Prävalenz von *Borrelia burgdorferi* sensu lato beim Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) in Ostbrandenburg [Dissertation med. vet.]. Berlin: Freie Univ. Berlin; 2000.
- Hinaidy H. Ein weiterer Beitrag zur Parasitenfauna des Rotfuchses, *Vulpes vulpes* (L.), in Österreich. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1976;23:66–73.
- Hiniday H. Die Parasitenfauna des Rotfuchses, *Vulpes vulpes* (L.), in Österreich. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1971;18:21–32.
- Holzmann H, Kundi M, Stiasny K, Clement J, McKenna P, Kunz C, Heinz F. Correlation between ELISA, hemagglutination inhibition, and neutralization tests after vaccination against tick-borne encephalitis. *J Med Virol.* 1996;48:102–7.
- Hornok S, Sándor A, Beck R, Farkas R, Beati L, Kontschán J, Takács N, Földvári G, Silaghi C, Meyer-Kayser E, Hodžić A, Tomanović S, Abdullah S, Wall R, Estrada-Peña A, Duscher G, Plantard O. Contributions to the phylogeny of *Ixodes* (*Pholeoixodes*) *canisuga*, I. (Ph.)

Referenzen

kaiseri, I. (Ph.) *hexagonus* and a simple pictorial key for the identification of their females. Parasit Vectors. 2017;10:545.

Imhoff M, Hagedorn P, Schulze Y, Hellenbrand W, Pfeffer M, Niedrig M. Review: Sentinels of tick-borne encephalitis risk. Ticks Tick Borne Dis. 2015;6:592–600.

Janitza-Futterer, D. Serologische Untersuchungen zur endemischen Situation der Infektion mit dem FSME-Virus in einer südbadischen Pferde- und Hundepopulation. [Dissertation med. vet.]. München: Ludwig-Maximilians-Universität München; 2003.

Janko C, Schröder W, Linke S, König A. Space use and resting site selection of red foxes (*Vulpes vulpes*) living near villages and small towns in Southern Germany. Acta Theriol. 2012;57:245–50.

Janko C, Trappmann D, Schröder W, Linke S, König A, Freising. Populationsdichten des Rotfuchses (*Vulpes vulpes*) im Stadt-Land-Gradienten und deren Determinanten. Beitr Jagd Wildforsch. 2013;38:89–94.

Jemersić L, Deždek D, Brnić D, Prpić J, Janicki Z, Keros T, Roić B, Slavica A, Terzić S, Konjević D, Beck R. Detection and genetic characterization of tick-borne encephalitis virus (TBEV) derived from ticks removed from red foxes (*Vulpes vulpes*) and isolated from spleen samples of red deer (*Cervus elaphus*) in Croatia. Ticks Tick Borne Dis. 2014;5:7–13.

Karbowiak G, Stanko M, Miterpaková M, Hurníková Z, Víchová B. Ticks (Acari: Ixodidae) Ticks Parasitizing Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Slovakia and New Data About Subgenus Pholeoixodes Occurrence. Acta Parasitol. 2020;65:636–643.

Kheisin E, Lavrenenko L. Duration of blood-sucking and daily rhythm of feeding and dropping of females of *Ixodes ricinus* L. Zool Zh. 1956;35:379–83.

Kiffner C, Zucchini W, Schomaker P, Vor T, Hagedorn P, Niedrig M, Rühle F. Determinants of tick-borne encephalitis in counties of southern Germany, 2001-2008. Int J Health Geogr. 2010;9:42.

Klaus C, Beer M, Saier R, Schau U, Moog U, Hoffmann B, Diller R, Süss J. Goats and sheep as sentinels for tick-borne encephalitis (TBE) virus – epidemiological studies in areas endemic and non-endemic for TBE virus in Germany. Ticks Tick Borne Dis. 2012;3:27–37.

Referenzen

- Klaus C, Beer M, Saier R, Schubert H, Bischoff S, Süss J. Evaluation of serological tests for detecting tick-borne encephalitis virus (TBEV) antibodies in animals. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2011;124:443–9.
- Klaus C, Hoffmann B, Hering U, Mielke B, Sachse K, Beer M, Süss J. Tick-borne encephalitis (TBE) virus prevalence and virus genome characterization in field-collected ticks (*Ixodes ricinus*) from risk, non-risk and former risk areas of TBE, and in ticks removed from humans in Germany. *Clin Microbiol Infect.* 2009;16:238–44.
- Klaus C, Ziegler U, Kalthoff D, Hoffmann B, Beer M. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) - findings on cross reactivity and longevity of TBEV antibodies in animal sera. *BMC Vet Res.* 2014;10:78.
- Klompen H. Ticks, the Ixodida. Development and Morphology. In: Marquardt WC, Kondratieff BC, Hrsg. *Biology of disease vectors.* 2. Aufl. Burlington, MA; 2005. p. 45–57.
- Knap N, Korva M, Dolinšek V, Sekirnik M, Trilar T, Avšič-Županc T. Patterns of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Rodents in Slovenia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012;12:236–42.
- Kocan K, La Fuente J de, Coburn L. Insights into the development of *Ixodes scapularis*: a resource for research on a medically important tick species. *Parasit Vectors.* 2015;8:592.
- Kovalev S, Mukhacheva T. Reconsidering the classification of tick-borne encephalitis virus within the Siberian subtype gives new insights into its evolutionary history. *Infect Genet Evol.* 2017;55:159–65.
- Kozuch O, Nosek J. Transmission of tick-borne encephalitis (TBE) virus by *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks. *Acta Virol.* 1971;15:334.
- Kozuch O, Nosek J. Experimental transmission of tick-borne encephalitis (TBE) virus by *Haemaphysalis concinna* ticks. *Acta Virol.* 1980;24:377.
- Król N, Chitimia-Dobler L, Dobler G, Karliuk Y, Birka S, Obiegala A, Pfeffer M. Tick burden on European roe deer (*Capreolus capreolus*) from Saxony, Germany, and detection of tick-borne encephalitis virus in attached ticks. *Parasitol Res.* 2020;119:1387–92.
- Labhardt, F. Der Rotfuchs. *Naturgeschichte, Ökologie und Verhalten dieses erstaunlichen Jagdwildes.* Hamburg und Berlin; 1990.

Referenzen

- Labuda M, Kozuch O, Zuffová E, Elecková E, Hails R, Nuttall P. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology*. 1997;235:138–43.
- Lebeda M. Findings of *Ixodes ricinus* in the deep layers of the skin and in the lymphatic ganglion (lymph node) of foxes (*Vulpes vulpes*). *Vet čas*. 1962;11:193–205.
- Liebisch A, Walter G. Ticks of domestic and wild animals in Germany: on the occurrence and biology of the hedgehog tick (*Ixodes hexagonus*) and the fox tick (*Ixodes canisuga*). *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 1986;93:447–50.
- Liebisch G, Hoffmann L, Pfeifer F, Liebisch A. Ticks of the red fox and their significance for Lyme borreliosis. *Zentralbl Bakteriол B*. 1997;286:246–7.
- Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *The Lancet*. 2008;371:1861–71.
- Lindqvist R, Upadhyay A, Överby A. Tick-Borne Flaviviruses and the Type I Interferon Response. *Viruses*. 2018;10:340.
- Litzba N, Zelená H, Kreil T, Niklasson B, Kühlmann-Rabens I, Remoli M, Niedrig M. Evaluation of different serological diagnostic methods for tick-borne encephalitis virus: enzyme-linked immunosorbent, immunofluorescence, and neutralization assay. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2014;14:149–59.
- Lledó L, Serrano J, Isabel Gegúndez M, Giménez-Pardo C, Saz J. Antibodies to *Rickettsia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in Spanish Wild Red Foxes (*Vulpes vulpes*). *J Wildl Dis*. 2016;52:122–5.
- Lorusso V, Lia R, Dantas-Torres F, Mallia E, Ravagnan S, Capelli G, Otranto D. Ixodid ticks of road-killed wildlife species in southern Italy: new tick-host associations and locality records. *Exp Appl Acarol*. 2011;55:293–300.
- Luckschander N, Kölbl S, Enzesberger O, Zipko H, Thalhammer J. Frühsommermeningoenzephalitis-(FSME-) Infektion in einer österreichischen Pferdepopulation. *Tierarztl Prax*. 1999;27:235–8.
- Lutz W. Beitrag zur Nahrung des Rotfuchses (*Vulpes vulpes* [L.]) im „Nationalpark Bayerischer Wald“. *Z Jagdwiss*. 1978;24:1–9.

Referenzen

- Lv J, Wu S, Zhang Y, Zhang T, Feng C, Jia G, Lin X. Development of a DNA barcoding system for the Ixodida (Acari: Ixodida). *Mitochondrial DNA*. 2013;25:142–9.
- MacDonald D. On food preference in the Red fox. *Mammal Review*. 1977;7:7–23.
- MacDonald, D. W. Unter Füchsen. Eine Verhaltensstudie. München; 1993.
- Magi M, Calderini P, Gabrielli S, Dell'Omodarme M, Macchioni F, Prati M, Cancrini G. *Vulpes vulpes*: a possible wild reservoir for zoonotic filariae. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008;8:249–52.
- Marks C, Bloomfield T. Home-range size and selection of natal den and diurnal shelter sites by urban red foxes (*Vulpes vulpes*) in Melbourne. *Wildl. Res*. 2006;33:339–47.
- Marquardt WC, Kondratieff BC. *Biology of disease vectors*. 2. Aufl. Burlington, MA; 2005.
- Matysiak A, Wasielewski O, Włodarek J, Ondrejko A, Tryjanowski P. First report of ticks in the subcutaneous tissue of the raccoon dog *Nyctereutes procyonoides*. *Vet Med*. 2018;63:571–4.
- Meyer-Kayser E, Hoffmann L, Silaghi C, Passos L, Mahling M, Pfister K. Tick infestation of foxes in Thuringia with special focus on foxes with scabies. *Vet Med Austria*. 2011;98:292–6.
- Meyer-Kayser E, Hoffmann L, Silaghi C, Pfister K, Mahling M, Passos L. Dynamics of tick infestations in foxes in Thuringia, Germany. *Ticks Tick-Borne Dis*. 2012;3:232–9.
- Müller K, König M, Thiel H. Die tick-borne Enzephalitis (TBE) unter besonderer Berücksichtigung der Infektion beim Pferd. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 2006;113:147–51.
- Najm N-A, Meyer-Kayser E, Hoffmann L, Herb I, Fensterer V, Pfister K, Silaghi C. A molecular survey of *Babesia* spp. and *Theileria* spp. in red foxes (*Vulpes vulpes*) and their ticks from Thuringia, Germany. *Ticks Tick Borne Dis*. 2014;5:386–91.
- Nosek J, Grulich I. The relationship between the Tick-borne Encephalitis Virus and the Ticks and Mammals of the Tribec Mountain Range. *Bull World Health Organ*. 1967;36:31–47.
- Nosek J, Kozuch O, Mayer V. Spatial distribution and stability of natural foci of tick-borne encephalitis virus in Central Europe. *Sitzungsberichte Heidelberger Akad Wiss*. 1978;60–74.

Referenzen

- Nowak-Chmura M, Siuda K. Ticks of Poland. Review of contemporary issues and latest research. *Ann Parasitol*. 2012;58:125–55.
- Nuttall G. Penetration of *Ixodes* beneath the skin. *Parasitology*. 1914;7:258–9.
- Oliver J. Biology and Systematics of Ticks (Acari:Ixodida). *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1989;20:397–430.
- Ortuño A, Sanfeliu I, Nogueras M, Pons I, López-Claessens S, Castellà J, Antón E, Segura F. Detection of *Rickettsia massiliae*/Bar29 and *Rickettsia conorii* in red foxes (*Vulpes vulpes*) and their *Rhipicephalus sanguineus* complex ticks. *Ticks Tick Borne Dis*. 2018;9:629–31.
- Otranto D, Cantacessi C, Dantas-Torres F, Brianti E, Pfeffer M, Genchi C, Guberti V, Capelli G, Deplazes P. The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe. Part II: Helminths and arthropods. *Vet Parasitol*. 2015;213:24–37.
- Pet'ko B, Stanko M. Finding of the tick *Ixodes ricinus* under the skin of a fox in Slovakia. *Slovakia Folia Vet*. 1991;21:159–62.
- Pfäffle M, Petney T, Skuballa J, Taraschewski H. Comparative population dynamics of a generalist (*Ixodes ricinus*) and specialist tick (*I. hexagonus*) species from European hedgehogs. *Exp Appl Acarol*. 2011;54:151–64.
- Pfeffer M, Leschnik M. TBE in animals – disease, infection source, reservoir host, and sentinel for human infection risk. In: Dobler G, Erber W, Schmitt HJ, Hrsg. *The TBE book*. Singapore; 2018. p. 91–103.
- Pintér R, Madai M, Horváth G, Németh V, Oldal M, Kemenesi G, Dallos B, Bányai K, Jakab F. Molecular detection and phylogenetic analysis of tick-borne encephalitis virus in rodents captured in the transdanubian region of Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2014;14:621–4.
- Radda A. Die Zeckenencephalitis in Europa. *Angew Zool*. 1973;60:409–61.
- Radda A, Hoffmann H, Kunz C. Viremia in some European carnivores after infection with tick-borne encephalitis (TBE) virus by ticks. *Zbl Bakt I Orig*. 1969;209:464–9.
- Radda A, Kunz C, Hofmann H. Nachweis von Antikörpern in Wildseren zur Erfassung von Herden des Virus der Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME) in Niederösterreich. *Zentralbl Bakteriol Orig*. 1968;208:88–93.

Referenzen

- Rauter C, Hartung T. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. Appl Environ Microbiol. 2005;71:7203–16.
- Reynolds J, Tapper S. The ecology of the red fox *Vulpes vulpes* in relation to small game in rural southern England. Wildlife Biol. 1995;1:105–19.
- Rieger M, Nübling M, Müller W, Hasselhorn H-M, Hofmann F. Foxes as indicators for TBE endemicity — a comparative serological investigation. Zentralbl Bakteriell B. 1999;289:610–8.
- Rizzoli A, Silaghi C, Obiegala A, Rudolf I, Hubálek Z, Földvári G, Plantard O, Vayssier-Taussat M, Bonnet S, Spitalská E, Kazimírová M. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. Front Public Health. 2014;2:251.
- Robert Koch-Institut. FSME: Risikogebiete in Deutschland (Stand: Januar 2019). Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos. Epid Bull. 2019;7:57–70.
- Robert Koch-Institut. FSME: Risikogebiete in Deutschland (Stand: Januar 2020). Epid Bull. 2020a;8:3–19.
- Robert Koch-Institut, 2020b. SurvStat@RKI 2.0. Online im WWW: <https://survstat.rki.de> (17.11.2020).
- Roehrig J, Hombach J, Barrett A. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. Viral immunol. 2008;21:123–32.
- Roelandt S, Suin V, van der Stede Y, Lamoral S, Marche S, Tignon M, Saiz J, Escribano-Romero E, Casaer J, Brochier B, van Gucht S, Roels S, Vervaeke M. First TBEV serological screening in Flemish wild boar. Infect Ecol Epidemiol. 2016;6:31099.
- Rubel F, Brugger K, Monazahian M, Habedank B, Dautel H, Leverenz S, Kahl O. The first German map of georeferenced ixodid tick locations. Parasit Vectors. 2014;7:477.
- Ruzek D, Avšič Županc T, Borde J, Chrdle A, Eyer L, Karganova G, Kholodilov I, Knap N, Kozlovskaya L, Matveev A, Miller A, Osolodkin D, Överby A, Tikunova N, Tkachev S, Zajkowska J. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. Antiviral Res. 2019;164:23–51.

Referenzen

- Sándor A, D'Amico G, Gherman C, Dumitrache M, Domşa C, Mihalca A. Mesocarnivores and macroparasites: altitude and land use predict the ticks occurring on red foxes (*Vulpes vulpes*). *Parasit Vectors*. 2017;10:173.
- Santoro M, Veneziano V, D'Alessio N, Di Prisco F, Lucibelli M, Borriello G, Cerrone A, Dantas-Torres F, Latrofa M, Otranto D, Galiero G. Molecular survey of *Ehrlichia canis* and *Coxiella burnetii* infections in wild mammals of southern Italy. *Parasitol Res*. 2016;115:4427–31.
- Schöffel I, Schein E, Wittstadt U, Hentsche J. Zur Parasitenfauna des Rotfuchses in Berlin (West). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 1991;104:153–7.
- Šimo L, Kazimirova M, Richardson J, Bonnet S. The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:281.
- Slovák M, Štibrániová I, Hajnická V, Nuttall P. Antiplatelet-derived growth factor (PDGF) activity in the saliva of ixodid ticks is linked with their long mouthparts. *Parasite Immunol*. 2014;36:32–42.
- Smith D, Frenkel J, Smith E. Intradermal infestation of a red fox (*Vulpes vulpes*) by the lone star tick (*Amblyomma americanum*). *J Wildl Dis*. 1986;22:122–4.
- Sobrino R, Millán J, Oleaga A, Gortázar C, La Fuente J de, Ruiz-Fons F. Ecological preferences of exophilic and endophilic ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing wild carnivores in the Iberian Peninsula. *Vet Parasitol*. 2012;184:248–57.
- Stefanoff P, Pfeffer M, Hellenbrand W, Rogalska J, Rühle F, Makówka A, Michalik J, Wodecka B, Rymaszewska A, Kiewra D, Baumann-Popczyk A, Dobler G. Virus detection in questing ticks is not a sensitive indicator for risk assessment of tick-borne encephalitis in humans. *Zoonoses Public Health*. 2013;60:215–26.
- Stefanoff P, Siennicka J, Kaba J, Nowicki M, Ferenczi E, Gut W. Identification of new endemic tick-borne encephalitis foci in Poland – a pilot seroprevalence study in selected regions. In *J Med Microbiol*. 2008;298:102–7.
- Stubbe, H. Buch der Hege. Band 1 Haarwild. Frankfurt/Main; 1988.

Referenzen

- Suppan J, Engel B, Marchetti-Deschmann M, Nürnberger S. Tick attachment cement - reviewing the mysteries of a biological skin plug system. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2018;93:1056–76.
- Thomas S, Nisalak A, Anderson K, Libraty D, Kalayanarooj S, Vaughn D, Putnak R, Gibbons R, Jarman R, Endy T. Dengue plaque reduction neutralization test (PRNT) in primary and secondary dengue virus infections: How alterations in assay conditions impact performance. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;81:825–33.
- Tonteri E, Jääskeläinen A, Tikkakoski T, Voutilainen L, Niemimaa J, Henttonen H, Vaheri A, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis virus in wild rodents in winter, Finland, 2008-2009. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:72–5.
- van der Poel W, van der Heide R, Bakker D, Loeff M de, Jong J de, van Manen N, Gaasenbeek C, Borgsteede F. Attempt to Detect Evidence for Tick-Borne Encephalitis Virus in Ticks and Mammalian Wildlife in the Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2005;5:58–64.
- Vor T, Kiffner C, Hagedorn P, Niedrig M, Rühle F. Tick burden on European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Exp Appl Acarol*. 2010;51:405–17.
- Walker M. The hedgehog tick, *Ixodes hexagonus* (Leach, 1815) (Acari: Ixodidae); The natural history and ecology of a nest ectoparasite. *Syst Appl Acarol*. 2018;23:680.
- Walton Z, Samelius G, Odden M, Willebrand T. Variation in home range size of red foxes *Vulpes vulpes* along a gradient of productivity and human landscape alteration. *PloS one*. 2017;12:e0175291.
- White J, Gubiani R, Smallman N, Snell K, Morton A. Home range, habitat selection and diet of foxes (*Vulpes vulpes*) in a semi-urban riparian environment. *Wildl Res*. 2006;33:175–80.
- Wurm R, Dobler G, Peters M, Kiessig S. Serological investigations of red foxes (*Vulpes vulpes* L.) for determination of the spread of tick-borne encephalitis in Northrhine-Westphalia. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2000;47:503–9.
- Zakrisson G. Ticks, *Ixodes ricinus* in the sub-cutaneous tissues of a dog and foxes. *Svensk Veterinärtidning*. 2010;62:25–7.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Geografische Verbreitung des Rotfuchses nach LABHARDT 1990	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Fuchs-Populationsdichten (Füchse pro km ²) im Stadt-Land Gradienten (JANKO et al. 2013)	4
Abbildung 3: Übertragungszyklus des FSME-Virus modifiziert nach PFEFFER und DOBLER (2011)	13

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zecken-übertragene Pathogene des Rotfuchses in Europa	10
--	----

8. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Martin Pfeffer bedanken für die beste Betreuung, die man sich als Doktorand wünschen kann. Durch seinen unerschütterlichen Optimismus habe ich nie den Glauben an mich oder diese Arbeit verloren. Ein ganz besonderer Dank geht außerdem an Anna Obiegala, die durch das intensive Korrekturlesen und die zahlreichen Tipps und Tricks diese Arbeit deutlich aufgewertet hat.

Ganz besonders möchte ich Josef Segbers, Andreas Leppmann und Peter Truch und seiner Familie danken. Durch euch habe ich die einzigartige Möglichkeit bekommen eine Vielzahl von Füchsen in so kurzer Zeit zu untersuchen. Eure Unterstützung hat diese Arbeit erst möglich gemacht.

Vielen lieben Dank an das ganze Team des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dana Rüster, die stets das Unmögliche möglich macht und immer gute Laune hat.

Herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei Gerhard Dobler, Lidia Chitimia-Dobler und Philipp Girtl für die Gastfreundschaft am IMB, die Geduld meine zahlreichen Anrufe und Emails zu beantworten und dem wissenschaftlichen Input.

Mein größter Dank gilt meinem Partner Fabian Belau und meinen felligen Freunden Daryl und Fornel. Danke für eure emotionale und moralische Unterstützung.

Ein großes Dankeschön geht an meine Freunde Christin Ademeit und Elisabeth Schmidt, die meine Launen ertragen haben und mich immer wieder zum Lachen gebracht haben. Sowie an meine Eltern, meine Schwiegereltern in spe und meinen Freunden, die mich immer unterstützt haben.