

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

**Seroprävalenz der Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus-Infektion bei wildlebenden
Nagern aus zwei Naturherden in Bayern, Deutschland**

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

eingereicht von
Philipp Johannes Brandenburg
aus Wiesbaden

Leipzig, 2023

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. Martin Beer, Institut für Virusdiagnostik, Friedrich-Loeffler-Institut,
Greifswald – Insel Riems

Tag der Verteidigung: 04.07.2023

Für meine Familie

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSME-Virus)	3
2.1.1	Geschichte des FSME-Virus	3
2.1.2	Taxonomie und Morphologie des FSME-Virus.....	3
2.1.3	Verbreitung der FSME in Deutschland	5
2.1.4	Taxonomie und Entwicklung von FSME-Virus Vektoren	7
2.1.5	Übertragungszyklus des FSME-Virus	8
2.1.6	Klinik und Pathogenese der FSME.....	9
2.1.6.1	FSME beim Menschen	10
2.1.6.2	FSME bei Tieren	11
2.1.7	Veterinärmedizinische Diagnostik.....	12
2.1.8	Therapie und Prophylaxe	12
2.2	Reservoirwirte des FSME-Virus	14
2.2.1	Die Rötelmaus (<i>Clethrionomys glareolus</i>)	14
2.2.1.1	Taxonomie und Morphologie	14
2.2.1.2	Lebensraum und Verbreitung.....	14
2.2.1.3	Reservoir und Überträger des FSME-Virus.....	15
2.2.2	Die Gelbhalsmaus (<i>Apodemus flavicollis</i>).....	16
2.2.2.1	Taxonomie und Morphologie	16
2.2.2.2	Lebensraum und Verbreitung.....	16
2.2.2.3	Reservoir und Überträger des FSME-Virus.....	17
2.2.3	Sonstige Wirbeltiere	17
3	Publikation	20
4	Diskussion und Schlussfolgerung	40
5	Zusammenfassung	47
6	Summary	49
7	Referenzen	51
7.1	Literaturverzeichnis	51
7.2	Abbildungsverzeichnis	65
7.3	Tabellenverzeichnis	66
8	Danksagung.....	67

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
<i>A. flavicollis</i>	<i>Apodemus flavicollis</i>
bzw.	beziehungsweise
<i>C. glareolus</i>	<i>Clethrionomys glareolus</i>
DC	dendritische Zellen
DDR	Deutsche Demokratische Republik
d.h.	das heißt
<i>D. marginatus</i>	<i>Dermacentor marginatus</i>
<i>D. reticulatus</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
FSME-Virus	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
ggfls.	gegebenenfalls
<i>H. concinna</i>	<i>Haemaphysalis concinna</i>
<i>H. punctata</i>	<i>Haemaphysalis punctata</i>
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IFT	Immunfluoreszenztest
IIFA	indirect immunofluorescence assay
IIFT	indirekter Immunfluoreszenztest
<i>I. persulcatus</i>	<i>Ixodes persulcatus</i>
<i>I. ricinus</i>	<i>Ixodes ricinus</i>
kb	Kilobasen
LK	Landkreis

NSAID	nichtsteroidales Antiphlogistikum
ORF	Open-Reading-Frame (Offener Leserahmen für ein Gen)
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SK	Stadtkreis
SNT	Serumneutralisationstest
spp.	species pluralis
TBEV	Tick-borne encephalitis virus
TBEV-Bkl	Baikal-Subtyp des Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
TBEV-Eur	Europäischer Subtyp des Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
TBEV-FE	Fernöstlicher Subtyp des Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
TBEV-Him	Himalaya-Subtyp des Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
TBEV-Ob	Obskaja-Subtyp des Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
TBEV-Sib	Sibirischer Subtyp des Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
UdSSR	Union der Sozialistischen Sowjetrepubliken
UTR	nicht translatierte Region
u.a.	unter anderem
VNT	Virusneutralisationstest
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	zentrales Nervensystem
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) ist die medizinisch wichtigste, durch Zecken übertragene virale Erkrankung des Menschen in Europa und Asien, welche jährlich 10.000 – 15.000 humane Fälle auf beiden Kontinenten verursacht (DOBLER 2010). Mittlerweile erstreckt sich das Verbreitungsgebiet der FSME zwischen Japan und Frankreich und breitet sich in den letzten Jahren immer weiter in nördlicher Richtung in Nord-Russland, Schweden und Finnland aus (DOBLER et al. 2012). Seit 2001 ist die FSME in Deutschland nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) eine meldepflichtige Erkrankung und das Robert-Koch-Institut (RKI) dazu beauftragt Falldefinitionen zu erstellen, die die Kriterien für die Übermittlung an das RKI festlegen. Nach dem Rekordjahr 2020 mit über 700 gemeldeten FSME-Fällen bei Menschen in Deutschland hat das RKI mittlerweile die Zahl der FSME-Risikogebiete von 175 auf 178 im Jahr 2023 erweitert, wobei die wesentlichen Endemiegebiete in Bayern, Baden-Württemberg, Südhessen, im südlichen Thüringen, in Sachsen und seit 2022 auch im südöstlichen Brandenburg liegen. Als FSME-Risikogebiet definiert das RKI einen Kreis, der in einem durchgängigen Fünfjahresintervall die Inzidenz von 1/100.000 Einwohner überschreitet (ROBERT KOCH-INSTITUT 2023a).

Das FSME-Virus wird in drei genetische Subtypen eingeteilt: den Europäischen (TBEV-Eur), den Fernöstlichen (TBEV-FE) und den Sibirischen Subtyp (TBEV-Sib), mit mindestens vier weiteren angenommenen Subtypen: zwei Baikalsee-Subtypen (TBEV-Bkl-1, TBEV-Bkl-2), der Himalaya-Subtyp (TBEV-Him) und der Obskaja-Subtyp (TBEV-Ob) (DEVIATKIN et al. 2020). Die überwiegende Mehrheit der FSME-Infektionen beim Menschen verlaufen asymptomatisch, dennoch kann sich FSME mit Fieber und akut progressiver Enzephalitis bis hin zu anhaltenden, neurologisch beeinträchtigenden Folgeerscheinungen manifestieren und sogar in weniger als 2 % zum Tod führen. Damit hat die FSME erhebliche Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit in endemischen Regionen wie Mittel- und Osteuropa, Sibirien, Ostrussland, Nordchina und Japan (RUZEK et al. 2009, VALARCHER et al. 2015, BOGOVIC und STRLE 2015). Alle FSME-Subtypen werden in der Natur in komplexen, endemischen Übertragungszyklen aufrechterhalten, sogenannten Mikrofoki, mit einer durchschnittlichen Größe von 0,5 bis 1 ha, an denen Zecken als natürliche Vektoren beteiligt sind. In Mitteleuropa sind *Ixodes ricinus* (*I. ricinus*) Zecken die Hauptüberträger des TBEV-Eur, und Nagetiere, insbesondere die Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus* (*C. glareolus*)) und die Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis* (*A. flavicollis*)), sind natürliche Säugetierwirte. Sowohl

Zecken, durch ihre transstadiale Infektion, als auch Nagetiere, stellen Reservoirwirte für das Virus dar. (BORDE et al. 2022, LABUDA und RANDOLPH 1999). Der Mensch infiziert sich mit dem FSME-Virus durch einen Zeckenstich, durch den Verzehr von infizierter Rohmilch oder entsprechenden Milchprodukten und in seltenen Fällen durch Organtransplantationen oder Muttermilch (DOBLER et al. 2012, LIPOWSKI et al. 2017, KERLIK et al. 2022). Die große Bedeutung von Nagetieren, insbesondere der Rötelmaus, als Teil des FSME-Virus Übertragungszyklus, wurde in den vergangenen Jahrzehnten bestätigt. Es gibt jedoch immer noch Wissenslücken über die Dynamik der FSME-Virusinfektion in Nagetierpopulationen in natürlichen FSME-Mikrofoki. So sind die sich verändernde FSME-Virus Seroprävalenz bei Nagetieren über einen kontinuierlichen Zeitraum, die Persistenz von Antikörpern in Nagetieren in der Natur und demografische Faktoren, wie Fangort, Jahr, Jahreszeit, Art, Alter und Geschlecht und deren Einfluss auf die Infektionswahrscheinlichkeit der Nager, nicht hinreichend geklärt. Bessere Kenntnis über die Übertragungsdynamik von FSME-Virus in den Herden könnten dazu beitragen, Zeiträume mit hoher FSME-Virus Prävalenz in der Natur und damit gegebenenfalls (ggfls.) längere Risikoperioden für Infektionen beim Menschen vorherzusagen. Die vorliegende Doktorarbeit hat daher das Ziel, über die vierjährige Studie wildlebende Nagetierpopulationen zweier gut beschriebener FSME-Virus Naturherde in Bayern serologisch auf Antikörper gegen das FSME-Virus zu untersuchen, wozu eine Fang-Wiederfang-Methode verwendet wurde, um Daten über die saisonale Dynamik in den Nagern zu erhalten und einen besseren Einblick in die lokale Ökologie der FSME-Virus-Übertragung zu gewinnen.

2 Literaturübersicht

2.1 Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSME-Virus)

2.1.1 Geschichte des FSME-Virus

Die FSME wurde klinisch-epidemiologisch in der westlichen Fachliteratur erstmals 1931 durch den österreichischen Internisten Dr. Johann (Hans) Schneider in Niederösterreich als epidemische akute „Meningitis serosa“ beschrieben (SCHNEIDER 1931, DUMPIS et al. 1999). Im Jahre 1937 gelang Lev Alexandrovich Zil'ber und seinen Mitarbeitern schließlich die Krankheitsursache, das FSME-Virus, in der früheren Union der Sozialistischen Sowjetrepubliken (UdSSR) nachzuweisen, welches durch Zecken der Art *Ixodes persulcatus* (*I. persulcatus*) übertragen wird (ZLOBIN et al. 2017, DUMPIS et al. 1999). Eine weitere Expedition wurde 1938 vom Gesundheitsministerium der UdSSR unter der Leitung von Evgeny Pavlovsky entsandt, um mehr über die Verbreitung des FSME-Virus im Feld und die beteiligten Reservoirwirte zu erfahren. Weitgehend auf der Grundlage der Erkenntnisse dieser Expedition entwickelte Pavlovsky das berühmte Konzept „The Natural Nidality of Transmissible Diseases“ (Die natürliche Herdstruktur übertragbarer Krankheiten), in dem er beschreibt, dass sich Zecken während einer Blutmahlzeit auf einem infizierten Wirt mit dem FSME-Virus infizieren, dass die Zecke transstadial infiziert bleibt und das Virus bei der nächsten Blutmahlzeit auf andere Wirte übertragen wird (PAVLOVSKY 1939, PAVLOVSKY 1966). In Deutschland stammen die ersten Beschreibungen von FSME und die ersten Virusisolierungen aus dem Jahr 1959 aus der ehemaligen Deutschen Demokratischen Republik (DDR) (SINNECKER 1960). Der erste FSME-Impfstoff wurde 1976 von Christian Kunz entwickelt (KUNZ 2002).

2.1.2 Taxonomie und Morphologie des FSME-Virus

Das FSME-Virus gehört zur Gattung *Flavivirus* innerhalb der Familie Flaviviridae (lateinisch: „flavus“ – gelb, mit dem Gelbfieber-Virus als Typspezies) (ECKER et al. 1999, LINDQUIST und VAPALAHTI 2008). Die Gattung umfasst mehr als 70 Virusarten, die unterteilt werden in die von Zecken übertragenen Virusgruppe, der von Stechmücken übertragenen Virusgruppe (u.a. West-Nil-Virus, Dengue-Virus, Japanische-Enzephalitis-Virus, Gelbfieber-Virus, Zika-Virus) und der nicht durch Arthropoden übertragenen Virusgruppe. Die Gruppe der durch Zecken übertragenen Flaviviren wird weiter unterteilt in eine Untergruppe der Säugetiere assoziierten Flaviviren (u.a. Omsk-Hämorrhagische-Fieber-Virus, Powassan-Virus, Louping-III-

Virus, FSME-Virus) und eine Untergruppe der Seevögel assoziierten Flaviviren (u.a. Kadam-Virus, Meaban-Virus) (DOBLER et al. 2012). Das FSME-Virus gehört somit zu einer Gruppe von Viren, die als Arboviren (Arthropod-borne Virus) bezeichnet werden, die nach Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ausschließlich oder hauptsächlich durch blutsaugende Arthropoden übertragen werden (WHO SCIENTIFIC GROUP 1967).

Derzeit gibt es drei bestätigte genetische Subtypen des FSME-Virus: den Europäischen- (TBEV-Eur), den Fernöstlichen- (TBEV-FE) und den Sibirischen Subtyp (TBEV-Sib) (ECKER et al. 1999). Außerdem wird die Einführung von vier weiteren Subtypen vorgeschlagen: zwei Baikalsee-Subtypen (TBEV-Bkl-1, TBEV-Bkl-2), der Himalaya-Subtyp (TBEV-Him) und der Obsejansk-Subtyp (TBEV-Ob) (DEVIATKIN et al. 2020).

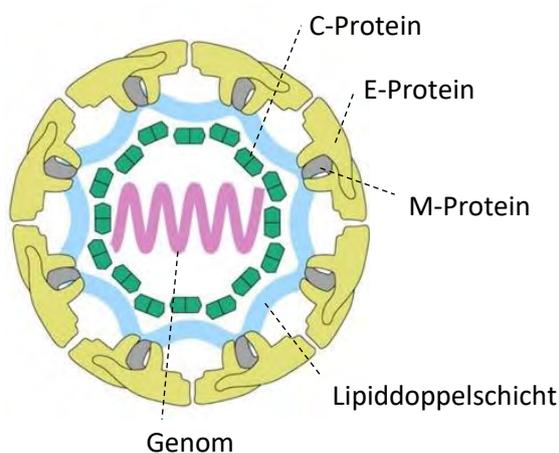


Abbildung 1: Schematische Darstellung der FSME-Viruspartikel Struktur; modifiziert nach PULKKINEN et al. (2018).

FSME-Viren sind kleine, behüllte Viren mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 50 nm (CHARREL et al. 2004) (Abbildung 1). Das Genom besteht aus einem einzelsträngigen Ribonukleinsäure (RNA)-Molekül (ss(+)RNA) mit einer Größe von 11 Kilobasen (kb), das einen offenen Leserahmen (Open-Reading-Frame (ORF)) enthält (SIMMONDS et al. 2017).

Dieser ORF kodiert für ein etwa 3.400 Aminosäuren (AS) großes Polyprotein (GRITSUN et al. 2003). Die 5'- und 3'-nicht translatierten Regionen (UTR), welche den ORF flankieren, haben eine entscheidende Rolle bei der Genomreplikation (THURNER et al. 2004). Das Polyprotein wird co- und posttranslational durch proteolytische Spaltung von viralen und zellulären Proteasen in die drei Strukturproteine C (Capsid), E (Envelope) und prM (precursor of Membrane) und in sieben nicht-Strukturproteine (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) prozessiert (Abbildung 2), die für die virale Replikation wesentlich sind (MANDL et al. 1989). Der RNA-Strang ist mit mehreren Kopien der C-Proteine komplex verbunden und bildet ein ikosaedrisches Nukleokapsid (KNIPE et al. 2007), das in eine Lipiddoppelschicht eingebettet ist (GRITSUN et al. 2003). Diese Lipiddoppelschicht enthält die M- und E-Proteine. Das E-Protein fungiert als das wichtigste Oberflächenprotein des Virus, das mit Zellrezeptoren interagiert und die pH-abhängige Fusion der Virushülle mit der Zellmembran vermittelt

(KNIPE et al. 2007) (Abbildung 1). Die virusneutralisierende humorale Immunantwort in den Säugetierwirten wird hauptsächlich über Antikörper gegen das E-Glykoprotein vermittelt (HEINZ 1986).

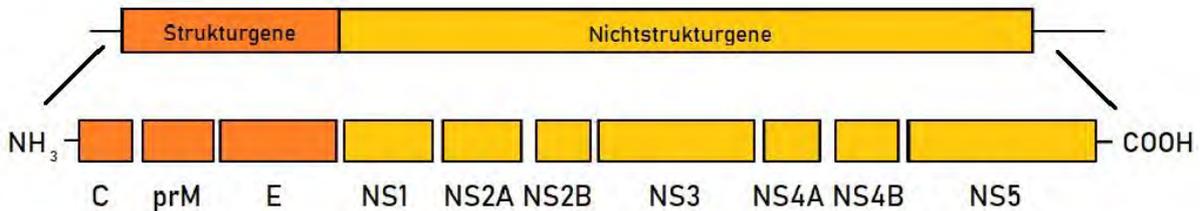


Abbildung 2: Schematische Darstellung des kodierenden Abschnittes eines FSME-Virus Genoms mit Darstellung der jeweiligen Genomabschnitte für die Strukturproteine (Capsid (C), precursor of Membrane (prM), Envelope (E)) und die nicht-Strukturproteine (NS1 – NS5); modifiziert nach KNIPE et al. (2007).

2.1.3 Verbreitung der FSME in Deutschland

Das Verbreitungsgebiet der FSME erstreckt sich von Zentral-, Nord- und Osteuropa über Russland, die Mongolei, Nordchina und Ostrussland bis nach Japan (VALARCHER et al. 2015, DOBLER et al. 2012). In Deutschland ist seit 2001 die FSME-Erkrankung des Menschen nach § 7 Abs. 1 Infektionsschutzgesetz (IfSG) eine meldepflichtige Krankheit. Pro Jahr werden durchschnittlich etwa knapp 400 Erkrankungen in Deutschland registriert, wobei die Zahlen zwischen 195 (Jahr 2012) und 717 (Jahr 2020) pendeln (ROBERT KOCH-INSTITUT 2023a) (Abbildung 3).

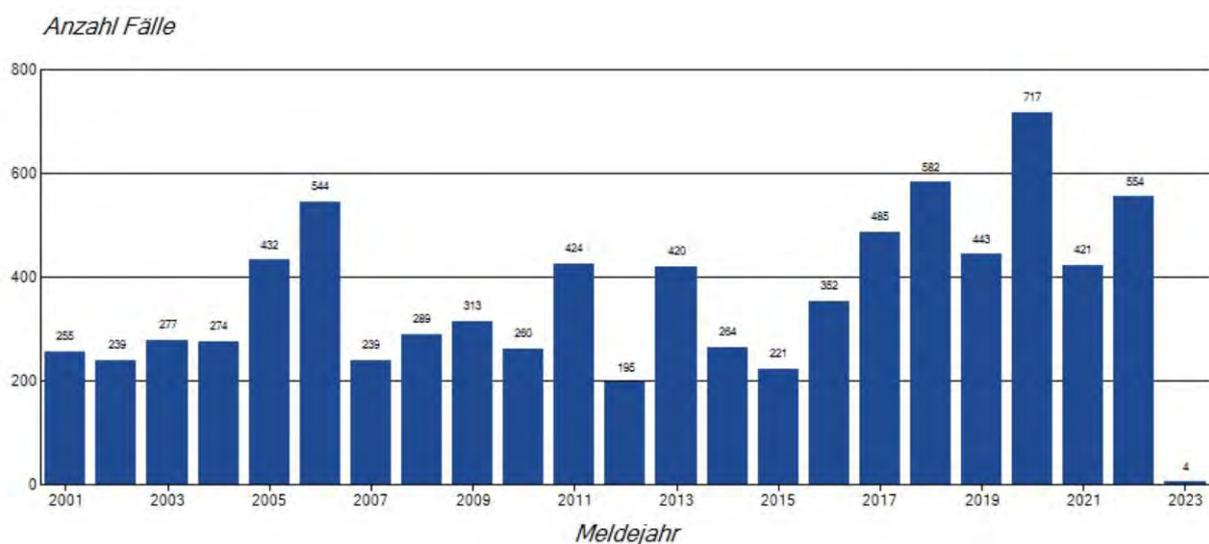


Abbildung 3: Gemeldete klinische FSME-Fälle zwischen 2001 und 2023 in Deutschland (ROBERT KOCH-INSTITUT 2023b, Stand 06.03.2023).

Das RKI benennt seit Ende der 1990er-Jahre jährlich FSME-Risikogebiete in Deutschland. Aktuell wird ein Kreis als FSME-Risikogebiet definiert, wenn die Anzahl übermittelter FSME-Erkrankungen im Kreis oder in der Kreisregion (Kreis plus alle angrenzenden Kreise) in einem

der 17 Fünfjahreszeiträume von 2002 bis 2022 signifikant ($p < 0,05$) höher liegt als die bei einer Inzidenz von einer Erkrankung pro 100.000 Einwohner erwartete Fallzahl (ROBERT KOCH-INSTITUT 2023a).

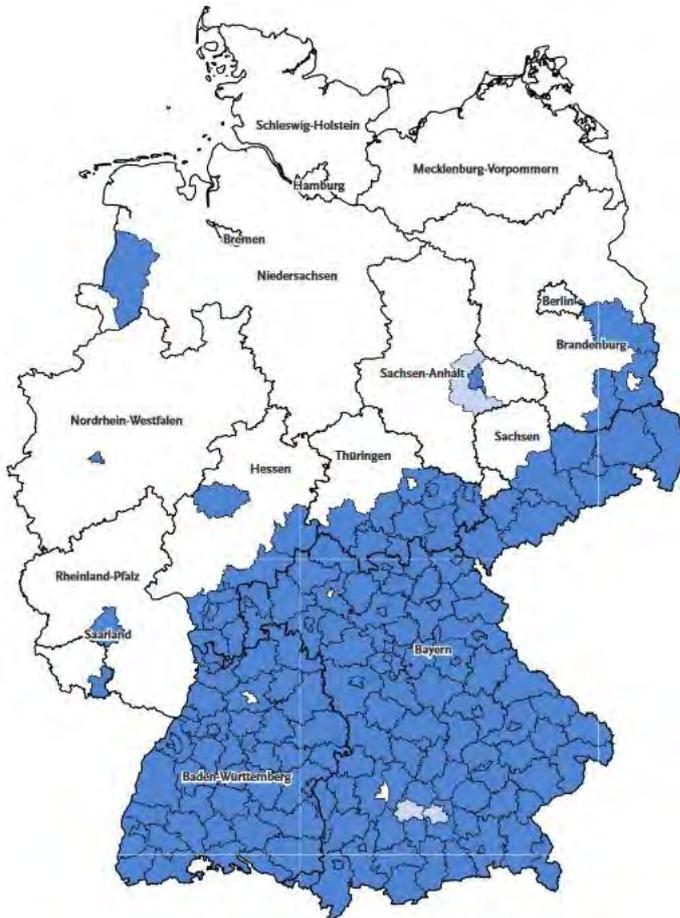


Abbildung 4: FSME-Risikogebiete in Deutschland; dunkelblau: FSME-Risikogebiete; hellblau: Risikogebiete die 2023 dazu gekommen sind; weiß: kein Risikogebiet (ROBERT KOCH-INSTITUT 2023a).

In ganz Deutschland gelten aktuell 178 Landkreise als Risikogebiet, 137 (77 %) davon in den südlichen Bundesländern Baden-Württemberg und Bayern. Im Jahr 2022 wurden insgesamt 554 FSME-Erkrankungen übermittelt und 2023 sind drei neue FSME-Risikogebiete dazu gekommen, von denen alle an bekannte Risikogebiete grenzen. In Bayern sind zwei weitere Kreise als Risikogebiet (Landkreis (LK) Fürstentumbruck, Stadtkreis (SK) München) definiert, wie auch der LK Anhalt-Bitterfeld in Sachsen-Anhalt (ROBERT KOCH-INSTITUT 2023a) (Abbildung 4). Die Mehrheit (98 %) der gemeldeten FSME-Patienten im Jahr 2022 war

überhaupt nicht oder zu wenig geimpft, also wiesen eine unvollständige Grundimmunisierung oder keine Auffrischungsimpfung vor (ROBERT KOCH-INSTITUT 2023a). Deutschland kann aus epidemiologischer Sicht in drei Regionen unterteilt werden (RUBEL und SCHIFFNER-ROHE 2019). Die Region Süddeutschland beinhaltet die Bundesländer Baden-Württemberg und Bayern. Seit Beginn der Meldepflicht wurden 84,7 % der humanen Fälle aus diesen beiden Bundesländern gemeldet (ROBERT KOCH-INSTITUT 2023b). Die Region Mitteldeutschland umfasst die Bundesländer Sachsen, Thüringen, Hessen, Rheinland-Pfalz und das Saarland. Dort treten in einzelnen Landkreisen immer wieder humane FSME-Fälle auf. Im Jahr 2022 wurden insgesamt 78 Fälle aus diesen Bundesländern übermittelt, was der höchsten Anzahl seit 2001 entspricht (ROBERT KOCH-INSTITUT 2023b). Die Region Norddeutschland umfasst die Bundesländer Schleswig-Holstein, Niedersachsen, Berlin,

Nordrhein-Westfalen, Sachsen-Anhalt, Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg sowie die Stadtstaaten Hamburg und Bremen. Aus diesen Regionen werden nur sporadisch FSME-Fälle übermittelt. Ein neues FSME-Risikogebiet, das 2023 hinzugekommen ist, stammt aus dieser Region (ROBERT KOCH-INSTITUT 2023a). Außerdem werden auch in Bundesländern ohne FSME-Risikogebiet vereinzelt FSME-Erkrankungen beobachtet, sodass überall in Deutschland bei entsprechender Symptomatik differenzialdiagnostisch an FSME gedacht werden muss (ROBERT KOCH-INSTITUT 2023a).

2.1.4 Taxonomie und Entwicklung von FSME-Virus Vektoren

Zecken sind obligat blutsaugende Ektoparasiten von Säugetieren, Reptilien und Vögeln, und sie sind der wichtigste Überträger (Vektor) von viralen, bakteriellen und parasitären Zoonosen (DEPLAZES et al. 2016). Taxonomisch gehören Zecken zum Stamm der Gliedertiere (Arthropoda) und werden weiter der Unterklasse Milben (Acari) innerhalb der Klasse Spinnentiere (Arachnida) zugeordnet. Die Ordnung Metastigmata wird weiter in drei Familien eingeteilt: Schildzecke (Ixodidae), Lederzecke (Argasidae) und Nuttalliellidae (MARQUARDT und KONDRATIEFF 2005).

Auch im natürlichen Infektionsgeschehen der FSME spielen Zecken der Familie Ixodidae als Vektoren bei allen FSME-Subtypen eine entscheidende Rolle, weshalb im Folgenden lediglich die Eigenschaften dieser Familie charakterisiert werden. FSME-Viren zirkulieren in bestimmten Gebieten, sogenannten Mikrofoki mit einer durchschnittlichen Größe von etwa 0,5 bis 1 ha, zwischen den Vektorzecken und bestimmten Reservoirwirten (Arten von Säugern und Vögeln), wie schon Pavlovsky (1966) in seinem Naturherdkonzept beschrieben hat (BORDE et al. 2022, PAVLOVSKY 1966). Die Übertragung des TBEV-Sib und des TBEV-FE erfolgt vor allem durch die Taigazecke (*I. persulcatus*), während in Mitteleuropa der TBEV-Eur primär durch die mit Abstand wichtigste Vektorzecke, den Gemeinen Holzbock (*I. ricinus*), übertragen wird (DOBLER et al. 2012). In Deutschland ist die Schildzeckengattung *Dermacentor* mit der Auwaldzecke (*Dermacentor reticulatus* (*D. reticulatus*)) und im Südwesten mit der Schafzecke (*Dermacentor marginatus* (*D. marginatus*)) vertreten (RUBEL et al. 2016, CHITIMIA-DOBLER et al. 2019). Auch die selten vorkommende Reliktzecke (*Haemaphysalis concinna* (*H. concinna*)) und *Haemaphysalis punctata* (*H. punctata*) als Vertreter der Schildzeckengattung *Haemaphysalis* sind nachgewiesene Vektoren des FSME-Virus (RUBEL et al. 2018).

Der Entwicklungszyklus der Ixodidae besteht aus vier Stadien: Ei, Larve, Nymphe und Adulte.

Nachdem der Eischlupf erfolgt ist, wird für das Erreichen der drei folgenden Entwicklungsstadien oder der Eiablage (Weibchen) jeweils eine Blutmahlzeit benötigt (OLIVER 1989). Der Entwicklungszyklus dauert mehrere Jahre, während die Blutmahlzeit auf dem Wirt nur wenige Tage bis über eine Woche andauert. Außerhalb des Wirtes halten sich Zecken in der offenen Vegetation oder in Tierbauten auf (OLIVER 1989). Da in Mitteleuropa *I. ricinus* die wichtigste Vektorzecke ist, wird der folgende Übertragungszyklus aus dieser Sicht beschrieben.

2.1.5 Übertragungszyklus des FSME-Virus

Das FSME-Virus persistiert in den Speicheldrüsen der Zecke, nachdem sie sich als Larve oder Nymphe durch eine Blutmahlzeit auf einem virämischen Wirt infiziert hat (MANSFIELD et al. 2009, LABUDA und RANDOLPH 1999). Eine andere Möglichkeit der Infektion erfolgt durch das sogenannte Co-feeding, wenn also eine nicht infizierte Zecke während des Saugakts auf dem gleichen Wirt dicht neben einer FSME-Virus tragenden Zecke sitzend sich infiziert, ohne dass eine systemische Virämie des Wirtstieres erforderlich ist (RANDOLPH 2011). Darüber hinaus dienen sie durch transstadiale (Infektion bleibt während der Häutung zu dem nächsten Zeckenstadium bestehen) und transovariable (Weitergabe des Virus von einem infiziertem Weibchen auf einen Teil der gelegten Eier) Übertragung innerhalb der Zeckenpopulation als Virusreservoir (KARBOWIAK und BIERNAT 2016). Bei der Befruchtung von einer männlichen Zecke auf das Weibchen kann eine horizontale Übertragung erfolgen (DOBLER et al. 2012) (Abbildung 5). Die drei blutsaugenden Stadien der Zecke (Larve, Nymphe, Adult) suchen für die Blutmahlzeit ein breites Spektrum an kleinen und großen Säugetieren und Vögeln auf. Die wichtigsten natürlichen Säugetierwirte für das FSME-Virus sind Nagetiere, insbesondere die Rötelmaus (*C. glareolus*) und die Gelbhalsmaus (*A. flavicollis*) (LABUDA und RANDOLPH 1999, DOBLER et al. 2012). Jüngste Studien deuten auf eine langanhaltende oder persistente Infektion bei Nagetieren in endemischen Gebieten hin (TONTERI et al. 2011, BAKHVALOVA et al. 2006) und die mögliche Übertragung des FSME-Virus auf ihre Nachkommen über die Muttermilch, wie in einer Fallstudie beim Menschen beschrieben (KERLIK et al. 2022). Der Mensch infiziert sich mit dem FSME-Virus durch einen Zeckenstich, durch den Verzehr von infizierter Rohmilch oder entsprechenden Milchprodukten oder in seltenen Fällen durch Organtransplantationen (DOBLER et al. 2012, LIPOWSKI et al. 2017) (Abbildung 5). Durch die standardisierte Pasteurisierung der Rohmilch,

spielt diese Übertragung in der westlichen Welt eine untergeordnete Rolle.

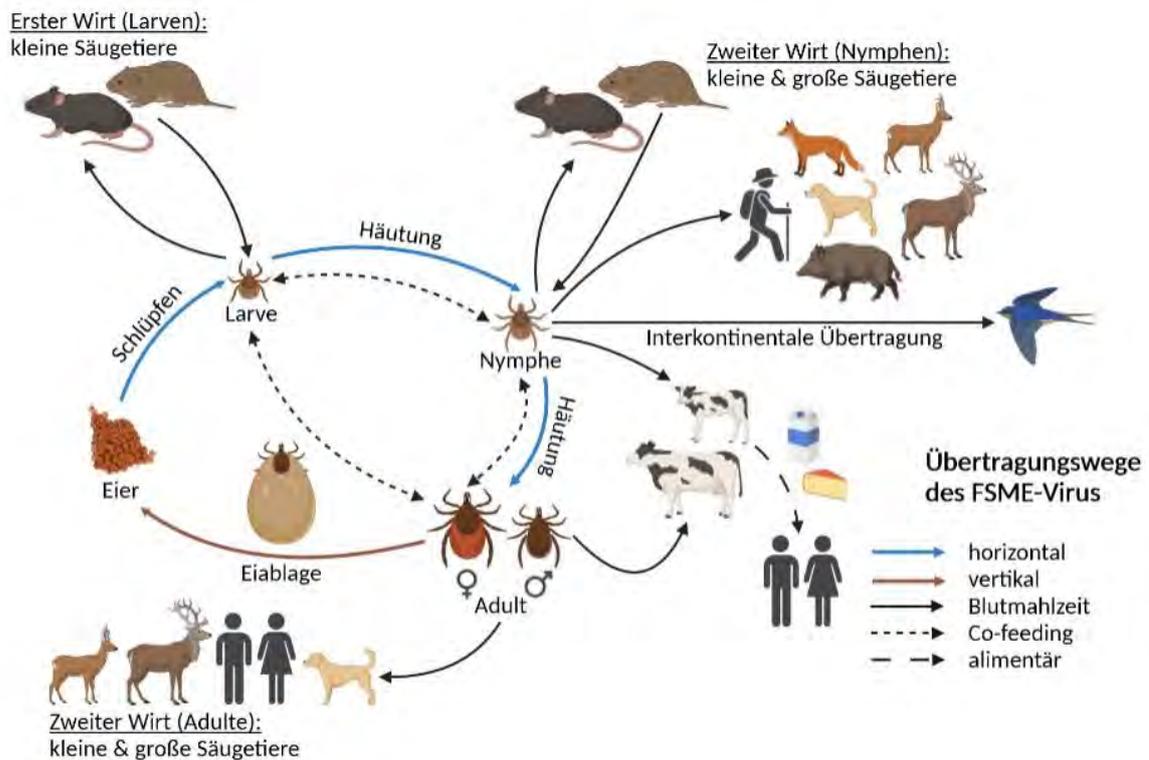


Abbildung 5: Übertragungszyklus des FSME-Virus. In der Vektorzecke *I. ricinus* oder *I. persulcatus* wird FSME-Virus während des Lebenszyklus entweder durch horizontale Übertragung (Infektion wird an das nächste Lebensstadium weitergegeben; blauer Pfeil) oder durch vertikale Übertragung (Übertragung der Infektion auf die nächste Zeckengeneration; brauner Pfeil) erhalten. Die verschiedenen Lebensstadien der Zecke (Larven, Nymphen, adulte Weibchen) ernähren sich mit unterschiedlicher Präferenz von den verschiedenen Wirtsarten, wobei die weniger reifen Stadien die kleineren Wirte bevorzugen. Der Hauptübertragungsweg des FSME-Virus auf das neue Vektorindividuum erfolgt durch eine Blutmahlzeit auf einem virämischen Wirt (schwarzer Pfeil) oder durch Co-feeding (gestrichelter Pfeil). Die Infektion des Menschen erfolgt meist durch den Befall mit infizierten Nymphen oder adulten Weibchen oder seltener über den alimentären Weg durch den Verzehr von nicht pasteurisierter Milch oder Milchprodukten (weit gestrichelter Pfeil); inspiriert von DOBLER et al. (2012); erstellt mit [BioRender.com](https://www.biorender.com).

2.1.6 Klinik und Pathogenese der FSME

Nach einem Zeckenstich vermehrt sich das FSME-Virus zunächst lokal in Hautzellen und später in Langerhans-Zellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten an der Einstichstelle (LABUDA et al. 1996, VALARCHER et al. 2015). Die Erkennung des Virus durch das angeborene Immunsystem führt zur Wanderung dendritischer Zellen (DC) zum primären Infektionsherd. Diese Zellen werden dort mit dem Virus infiziert und bringen es über das Lymphsystem zu einem regionalen Lymphknoten (VALARCHER et al. 2015). In ähnlicher Weise findet bei der Aufnahme von FSME-Virus über die Milch eine Replikation statt, wahrscheinlich zunächst in Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, bevor eine Übertragung auf DC erfolgt (DÖRRBECKER et al. 2010, VALARCHER et al. 2015). Nach einer Replikationsphase in DC, Makrophagen und möglicherweise T-Lymphozyten (DÖRRBECKER et al. 2010, LEONOVA und MAĪSTROVSKAIA 1996, VALARCHER et al. 2015) kommt es zu einer

Virämie, und das Virus breitet sich in andere Organe aus, insbesondere in das retikuloendotheliale System (Milz, Leber und Thymus) (DÖRRBECKER et al. 2010, VALARCHER et al. 2015). Hohe Virustiter sind erforderlich, damit das Virus die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann (HAGLUND und GÜNTHER 2003). Daher ist das FSME-Virus durch eine geringe Neuroinvasivität gekennzeichnet (RUZEK et al. 2010). Wenn zu wenig neutralisierende Antikörper bei Patienten gebildet wurden, kommt es zu einer Infektion des zentralen Nervensystems (ZNS). Die FSME-Viren befallen die Epithelzellen der Hirnhäute, die Purkinje-Zellen im Kleinhirn sowie die motorischen Kerne im Hirnstamm und Rückenmark (VALARCHER et al. 2015). Die Virusreplikation führt zu Nervenläsionen und Symptomen aufgrund eines Entzündungsprozesses, Zelllyse, Nekrose und Apoptose sowie einer zellulären Dysfunktion (DUMPIS et al. 1999, RUZEK et al. 2010, VALARCHER et al. 2015). Die Infektion von Neuronen führt zu der Migration von Mikroglia und FSME-Virus-spezifischer T-Lymphozyten in das ZNS und insbesondere in die graue Substanz. Die zytotoxische T-Lymphozyten-Reaktion ist für die Virusbeseitigung unerlässlich, kann aber auch zur Immunpathogenese führen, indem sie sich gegen infizierte Neuronen richtet (RUZEK et al. 2009, GELPI et al. 2006). In tödlichen Fällen beim Menschen, sind Meningitis und Polioenzephalomyelitis im Rückenmark, Hirnstamm und Kleinhirn lokalisiert und gehen mit entzündlichen und lymphozytären Zellinfiltrationen einher (RUZEK et al. 2010, VALARCHER et al. 2015).

2.1.6.1 FSME beim Menschen

Das FSME-Virus ist eine der Hauptursachen für Infektionen des ZNS beim Menschen und kann in allen Altersgruppen klinische Erkrankungen verursachen, wobei die Infektion bei Erwachsenen und älteren Menschen häufig schwerer verläuft (LINDQUIST und VAPALAHTI 2008, STUDAHL et al. 2013). Serologische Studien deuten darauf hin, dass die große Mehrheit der FSME-Fälle (70 – 98 %) asymptomatisch ist oder nur subklinische Symptome aufweist (GUSTAFSON et al. 1992, BOGOVIC und STRLE 2015). Die FSME-Virus-Subtypen unterscheiden sich in der Schwere der Erkrankung und der Letalität, wobei die klinischen Symptome ähnlich sind (CHARREL et al. 2004, GRITSUN et al. 2003, GÜNTHER und HAGLUND 2005). Die höchste Letalität (15 – 20 %) wird durch eine Infektion mit TBEV-FE ausgelöst (LINDQUIST und VAPALAHTI 2008, GRITSUN et al. 2003). Im Gegensatz dazu verursacht der TBEV-Sib eine weniger schwere Erkrankung mit einer Letalität bis zu 5 %, die sich chronisch manifestieren kann (LINDQUIST und VAPALAHTI 2008, GRITSUN et al. 2003). Die klinischen

Symptome einer TBEV-Eur Infektion sind biphasisch (DUMPIS et al. 1999, LINDQUIST und VAPALAHTI 2008, BOGOVIC et al. 2010). Die Inkubationszeit liegt zwischen zwei und 28 Tagen, mit einem Durchschnitt von sieben Tagen. Die virämische Phase, die zwischen zwei und acht Tagen andauert, ist durch grippeähnliche Symptome mit leichtem Temperaturanstieg, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Rücken- und Gliederschmerzen sowie Übelkeit gekennzeichnet (VALARCHER et al. 2015). Danach folgt eine Zeit ohne klinische Symptome, und bei einem Drittel der Patienten tritt eine zweite Krankheitsphase auf, die durch einen plötzlichen Fieberschub gekennzeichnet ist. In dieser Phase breitet sich das Virus auf das ZNS aus und verursacht Anorexie, Fieber, Kopfschmerzen, Erbrechen, Lichtscheue und manchmal sensorische Veränderungen, Sehstörungen, Paresen, Lähmungen oder sogar Koma (VALARCHER et al. 2015). Weitere Symptome sind Hyperkinese der Gliedmaßen und der Gesichtsmuskulatur, Lingualtremor, Krämpfe und Lähmungen der Atemmuskulatur (VALARCHER et al. 2015). Der Tod kann bereits eine Woche nach Ausbruch der klinischen Erkrankung eintreten. Bei 10 – 20 % der Patienten mit schwerer Erkrankung werden chronische neuropsychiatrische oder nervöse Folgeerscheinungen beobachtet, wie Depressionen, Konzentrationsschwächen oder Gesichts- oder Gliederparesen aufgrund einer chronischen Myelitis oder Enzephalitis (MANSFIELD et al. 2009, VALARCHER et al. 2015). Bei erwachsenen Patienten ist die Letalität vergleichbar mit dem TBEV-Sib, befindet sich jedoch meistens unter 2 % (ECKER et al. 1999, GRITSUN et al. 2003).

2.1.6.2 FSME bei Tieren

Während die FSME in der Humanmedizin immer größere Beachtung findet, wird sie mit Tieren kaum in Verbindung gebracht. Dennoch sind FSME-Virusinfektionen bei einer großen Anzahl von Tierarten bekannt. Hierbei muss man zwischen Wirten mit Reservoirkompetenz und Endwirten unterscheiden. Reservoirwirte (kleine und mittelgroße Säuger) entwickeln nach ihrer Infektion eine ausreichend hohe Virämie, wodurch sich saugende Zecken infizieren (siehe Kapitel 2.2), während bei Endwirten dies nicht der Fall ist und keine Übertragung des Virus auf saugende Zecken erfolgt (RUBEL und SCHIFFNER-ROHE 2019). Insgesamt zeigen Tiere nach einer FSME-Infektion unterschiedlich ausgeprägte klinische Symptome. Während die Infektion der meisten Wildtiere (Reservoirwirt) asymptomatisch verläuft (zum Beispiel (z.B.) Polarrötelmaus, *Clethrionomys rutilus*), können einige eine Enzephalitis entwickeln (z.B. Rötelmaus, *Clethrionomys glareolus*) (MICHELITSCH et al. 2021). Endwirte, wie z.B. Affen (z.B. *Macaca sylvanus*), können klinische Symptome und Läsionen

entwickeln, die denen vom Menschen ähneln (SÜSS 2008, SÜSS et al. 2007). Bei Nutztieren, wie Rindern, Schafen, Ziegen und Schweinen, werden nur selten klinische Symptome beobachtet (HUBÁLEK et al. 2014). Obwohl nur marginal vorhanden, gibt es Berichte über FSME bei Pferden mit klinischen Anzeichen wie schlechtem Allgemeinzustand, Anorexie, Ataxie, plötzlichen Krämpfen, Krampfanfällen und Lähmungen der Hals- und Schultermuskulatur (KLAUS et al. 2013, RUSHTON et al. 2013). Auch bei Hunden treten gelegentlich Fieber und klinische Anzeichen einer Infektion des ZNS auf. Infektionen mit FSME-Virus werden bei dieser Tierart wahrscheinlich unterdiagnostiziert (PFEFFER und DOBLER 2011, LESCHNIK et al. 2002).

2.1.7 Veterinärmedizinische Diagnostik

In der Veterinärmedizin wird die gleiche Diagnostik zum FSME-Nachweis verwendet wie in der Humanmedizin. Direkte Nachweismethoden, wie die Virusisolation, Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) oder die Immunhistochemie, sind durch das kurze Zeitfenster des möglichen Nachweises auszuklammern, mit Ausnahme von Haustieren wie Hunden und Pferden, die unter intensiver Beobachtung der Besitzer stehen. Durch den monatelangen Nachweis von Viren in verschiedenen Organen von Nagetieren, können diese Methoden ebenfalls dort angewendet werden (ACHAZI et al. 2011). Im Gegensatz dazu kann der indirekte Nachweis von spezifischen Antikörpern bei vielen Tierspezies angewendet werden. Dafür werden am meisten Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), Serumneutralisationstest (SNT) und Immunfluoreszenztest (IFT) benutzt. Der ELISA und der IFT sind nur Screening-Methoden für den Nachweis von Antikörpern, da es zu möglichen Kreuzreaktionen mit anderen Flaviviren, wie dem West-Nil-Virus oder dem Louping-III-Virus, kommen kann. Bei Nagetieren sind diese Kreuzreaktion allerdings zu vernachlässigen, da diese keine natürlichen Reservoirs in dem enzootischen Kreislauf dieser Viren sind (GILBERT et al. 2000). Der Goldstandard bleibt der SNT und ein SNT-Titer $\geq 1:10$ beweisend für eine FSME-Infektion (KLAUS et al. 2014). Da in Mitteleuropa mittlerweile andere Flaviviren endemisch sind, ist die Spezifitätstestung zu empfehlen (BECK et al. 2013).

2.1.8 Therapie und Prophylaxe

Behandlungsoptionen für die Ätiologie von FSME sind noch nicht verfügbar (KAISER 2008, KAISER 2016, LINDQUIST und VAPALAHTI 2008, VALARCHER et al. 2015). Bei Vorliegen neurologischer Symptome scheint eine antivirale Therapie wirkungslos zu sein, da das Virus

nicht mehr nachweisbar ist (STUDAHL et al. 2013, VALARCHER et al. 2015). Studien, die eine Behandlung mit spezifischen Immunglobulinen nach einer FSME-Virus-Exposition versuchten, zeigten, dass sich die Symptome nach Verabreichung verschlimmerten und die Behandlung abgesetzt wurde (WALDVOGEL et al. 1996, BRÖKER und KOLLARITSCH 2008, VALARCHER et al. 2015). Daher erfolgt die Behandlung in Bezug auf die klinischen Manifestationen von FSME hauptsächlich symptomatisch mit nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) (DUMPIS et al. 1999, STUDAHL et al. 2013, VALARCHER et al. 2015). In schweren Fällen werden gelegentlich Kortikosteroide eingesetzt, die zu einer raschen Besserung der Symptome führen sollen. Allerdings gibt es derzeit keine klinischen Studien, die den Erfolg entsprechender Behandlungen belegen (DUMPIS et al. 1999, MICKIENÉ et al. 2002, LINDQUIST und VAPALAHTI 2008). Unabhängig davon müssen Patienten mit Symptomen einer Meningoenzephalitis engmaschig überwacht werden, da ein Hirnödem innerhalb kurzer Zeit zu Koma oder Atemlähmung führen kann (DUMPIS et al. 1999). Einer FSME-Virusinfektion kann vorgebeugt werden, indem die potenziellen Überträger, Zecken und unbehandelte Milchprodukte, so weit wie möglich gemieden werden (DUMPIS et al. 1999). Auch die Anwendung von Repellentien, das Meiden möglicher Risikogebiete oder das Tragen von Schutzkleidung stellt keinen sicheren Schutz vor einer FSME-Virusinfektion dar (KUNZE et al. 2004, DEMICHELI et al. 2009). Um sich am besten vor der FSME-Erkrankung zu schützen, ist die FSME-Impfung die wirkungsvollste Maßnahme (DEMICHELI et al. 2009, WHO 2011, KOLLARITSCH et al. 2012, VALARCHER et al. 2015). Derzeit sind fünf FSME-Impfstoffe weltweit verfügbar (WHO 2011, DOBLER et al. 2020). Die Grundimmunisierung besteht aus drei bis vier separaten Impfungen aller Impfstoffe, mit Ausnahme der chinesischen Formulierung, bei der nur zwei Impfungen benötigt werden (KOLLARITSCH et al. 2012, VALARCHER et al. 2015, KAISER 2016, DOBLER et al. 2020). Für die Aufrechterhaltung des Impfschutzes sind Auffrischungsimpfungen alle drei bis fünf Jahre notwendig (KOLLARITSCH et al. 2012, VALARCHER et al. 2015, DOBLER et al. 2020). Derzeit gibt es keine zugelassenen Impfstoffe für den veterinärmedizinischen Gebrauch (VALARCHER et al. 2015).

2.2 Reservoirwirte des FSME-Virus

2.2.1 Die Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*)

2.2.1.1 Taxonomie und Morphologie



Abbildung 6: Die Rötelmaus (*C. glareolus*) (KOTLÍK et al. 2022).

Die Rötelmaus (*C. glareolus*) ist der Ordnung Rodentia und der Überfamilie der Mäuseartige (Muroidea) zugehörig. Innerhalb der Systematik werden sie weiter der Familie der Wühler (Cricetidae) und der Unterfamilie der Wühlmäuse (Arvicolinae) zugeordnet (AULAGNIER et al. 2009). Hauptmerkmal der Rötelmaus ist das rötlich braune bis fuchsig rote Rückenfell, der weiße Bauch und der für eine Wühlmaus lange zweifarbige Schwanz (40 – 70 mm, 50 % der Körperlänge) (KRAFT 2008) (Abbildung 6). Die Kopf-Rumpf-Länge beträgt 80 – 115 mm bei einem Gewicht von 15 – 35 g. Außerdem ist der Hinterfuß etwa 16–20 mm lang (KRAFT 2008). Die Rötelmaus ist ein Pflanzenfresser, der sich im Frühjahr und Sommer hauptsächlich von grünen Pflanzen und im Herbst und Winter hauptsächlich von Samen ernährt. Im Herbst wird die Nahrung durch Beeren, Früchte und Pilze ergänzt (VIRO und NIETHAMMER 1982).

2.2.1.2 Lebensraum und Verbreitung

Die tag- und nachtaktive Rötelmaus ist die häufigste Kleinsäugerart in Nadel- und Mischwäldern mit dichter Bodendeckung aus Farnen und anderen krautartigen Pflanzen. Hohe Individuendichten werden in feuchten bis nassen Waldtypen erreicht (KRAFT 2008). Wegen der Isolation einzelner Rötelmauspopulationen während der letzten Eiszeit konnten sich verschiedene genetische Linien über die Zeit entwickeln. Anfangs wurden fünf Rötelmaus-Linien beschrieben, drei in Südeuropa auf den mediterranen Halbinseln Iberiens (Spanien), Italiens und des Balkans sowie zwei weit verbreitete kontinentale Linien, eine westeuropäische Linie und eine östliche Linie, deren Verbreitung sich von Osteuropa bis Westsibirien erstreckt (DEFFONTAINE et al. 2005) (Abbildung 7). Später wurde eine weitere, stark abweichende Linie aus Kalabrien im äußersten Süden der italienischen Halbinsel beschrieben (COLANGELO et al. 2012) und eine Linie in der Nähe der Karpaten (KOTLÍK et al. 2006) (Abbildung 7). In Deutschland ist hauptsächlich die westliche Linie anzutreffen, wobei

im Nordosten auch die östliche und karpatische Linie gefunden werden kann (Abbildung 7).

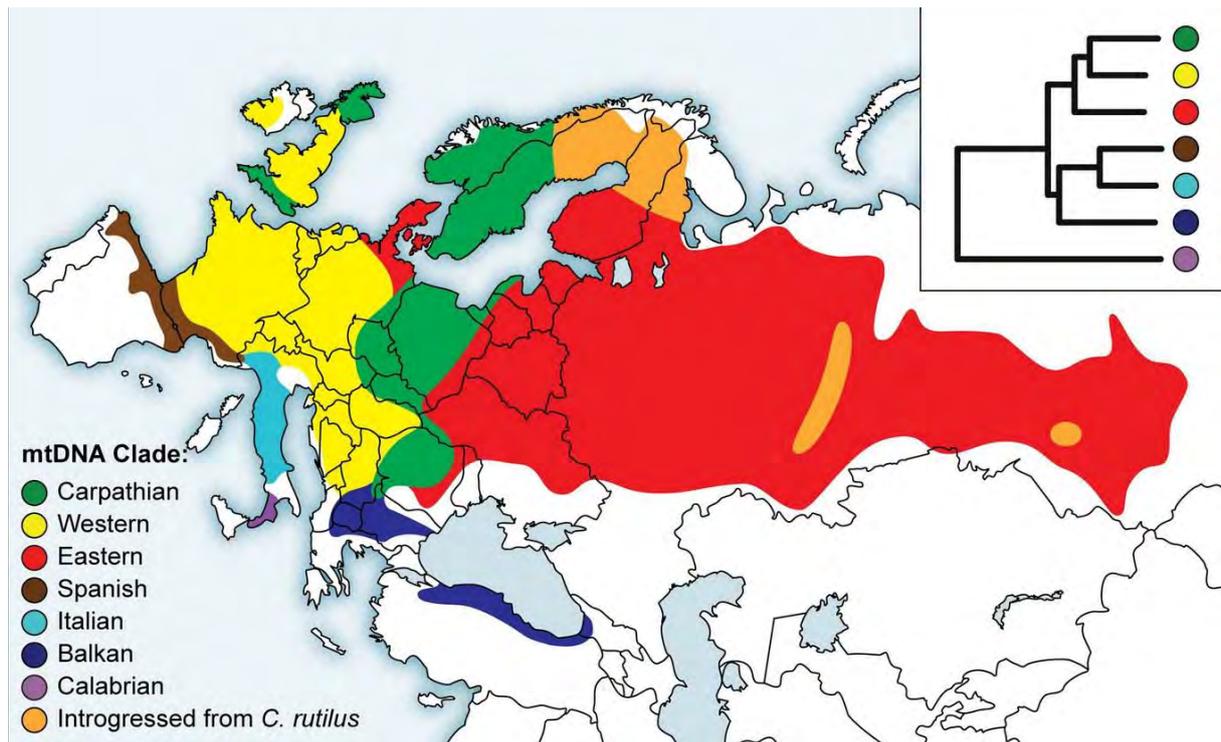


Abbildung 7: Verteilung der phylogeografischen Linien der Rötelmaus, abgeleitet aus den mitochondrialen DNA-Sequenzen (mtDNA Clade), mit einer schematischen Darstellung der Phylogenie im Bild oben rechts (KOTLÍK et al. 2022).

2.2.1.3 Reservoir und Überträger des FSME-Virus

Unter den Nagetieren hat die Rötelmaus den bedeutendsten Anteil am Erhalt und der Verbreitung des FSME-Virus innerhalb der Naturherde, welches in zahlreichen Studien bisher belegt wurde. In Tschechien wurde FSME-Virus spezifische RNA aus allen Gewebeproben (Lunge, Niere, Milz) einer Rötelmaus mittels RT-PCR amplifiziert (WEIDMANN et al. 2006). Rötelmäuse, die in ganz Slowenien gefangen wurden, wiesen im Vergleich zu anderen Nagetieren höhere Titer von FSME-Antikörpern auf, die mit einem IFT nachgewiesen wurden, sowie eine höhere Viruslast (KNAP et al. 2012). Die FSME-Virus Seropositivität von Nagetieren, die mit einem Virusneutralisationstest (VNT) getestet wurde, stieg parallel zum Anteil der Rötelmaus-Population in Ungarn (ZÖLDI et al. 2015a). Hirn- oder Milzgewebe von Nagetieren in Nicht-Risikogebieten in Brandenburg und Sachsen-Anhalt und Hochrisikogebieten in Hessen, das mittels RT-PCR auf FSME-Virus RNA untersucht wurde, zeigte, dass die höchsten Raten in Rötelmäusen zu finden sind. Darüber hinaus zeigten experimentelle FSME-Virus infizierte Rötelmäuse, dass das Virus für mindestens drei Monate in verschiedenen Organen und 50 Tage im Blut persistiert (ACHAZI et al. 2011). Insgesamt wurden 333 Nagerseren, die an vier Standorten in der Schweiz gesammelt wurden, mittels

IFT auf FSME-Antikörper getestet, wobei 8 von 12 positiven Proben Rötelmäusen stammten (BURRI et al. 2012). In Finnland wurde FSME-Virus RNA im Gehirn und in den Geweben der inneren Organe von zwei Wühlmausarten mittels RT-PCR in TBEV-Eur und TBEV-Sib Endemiegebieten mehrere Monate nach der Zeckensaison nachgewiesen (TONTERI et al. 2011). Im Nordosten von Polen wurden 14,8 % von 668 Rötelmaus-Seren positiv mit einem ELISA auf Antikörper gegen das FSME-Virus getestet (GRZYBEK et al. 2018). Rötelmäuse sind in den meisten Ökosystemen weit verbreitet, haben einen kleinen Lebensraum und werden stark von Zecken parasitiert und sind somit ein idealer Reservoirwirt für das FSME-Virus (ACHAZI et al. 2011).

2.2.2 Die Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*)

2.2.2.1 Taxonomie und Morphologie



Abbildung 8: Die Gelbhalsmaus (*A. flavicollis*) (www.kleinsaeugeter-bayern.de).

Die Gelbhalsmaus (*A. flavicollis*) ist ebenfalls der Überfamilie der Mäuseartige (Muroidea) innerhalb der Ordnung der Nagetiere (Rodentia) zugehörig. Weiter werden sie der Unterfamilie der Altweltmäuse (Murinae) innerhalb der Familie der Langschwanzmäuse (Muridae) zugeordnet (WILSON und REEDER 2005). Gelbhalsmäuse sind gekennzeichnet durch eine dunkle Rückenmitte, bedingt durch die Anhäufung von schwarzen Leit- und Deckhaaren. Die Seiten sind meist rot, während die Unterseite hellgrau oder reinweiß ist. Die Brust bildet einen goldenen, geschlossenen Kragen (KRAFT 2008) (Abbildung 8). Der Schwanz ist ähnlich lang wie der Körper eines erwachsenen Tieres, mindestens 80 – 130 mm. Die Kopf-Rumpflänge beträgt 80 – 120mm bei einem Gewicht von 20 – 45 g. Außerdem sind die Hinterfüße etwa 23 – 26 mm lang (KRAFT 2008). Nahrungsquelle sind vor allem Samen von Bäumen und Sträuchern, aber auch Ackerbewuchs, wie zum Beispiel Ackersenf oder Getreide. Arthropoden zählen ebenfalls zu ihrer Nahrung (NIETHAMMER und KRAPP 1978).

2.2.2.2 Lebensraum und Verbreitung

Die nachtaktive Gelbhalsmaus (SCHWARZENBERGER und KLINGEL 1995) zeichnet sich durch eine starke Bindung zum Wald oder zumindest zu Baum- und Strauchbewuchs aus. Sie ist besonders häufig in Laubwäldern, insbesondere in alten Beständen von Eichen, Buchen und

Hainbuchen mit geringer Krautschicht, wo sie die dominierende Kleinsäugerart ist (KRAFT 2008). Außerdem besiedelt sie auch offene Lebensräume wie Hecken und Areale von Gebüsch (NIETHAMMER und KRAPP 1978). Die Gelbhalsmaus kommt fast überall in Europa vor, fehlt aber in Westfrankreich, auf der Iberischen Halbinsel (außer im hohen Norden) und auf allen großen Mittelmeerinseln. In England ließ sie sich nur im Süden nieder. Im Osten reicht das Territorium bis zum Ural, südöstlich bis zum Kaukasus (KRAFT 2008).

2.2.2.3 *Reservoir und Überträger des FSME-Virus*

Die Gelbhalsmaus gilt neben der Rötelmaus als weiterer wichtiger Wirt mit Reservoirkompetenz zum Erhalt und Verbreitung des FSME-Virus innerhalb der Naturherde. In Tschechien konnten mittels SNT bei 1,4 % der untersuchten Gelbhalsmäuse Antikörper gegen das FSME-Virus gefunden werden (ZEMAN und JANUŠKA 1999). Gelbhalsmäuse, die in ganz Slowenien gefangen wurden, zeigten eine Seroprävalenz von 3,9 %, die mit einem IFT nachgewiesen wurde (KNAP et al. 2012). In der Slowakei konnte sogar bei 717 untersuchten Gelbhalsmäusen mit einem SNT eine höhere Seroprävalenz (18,1 %) nachgewiesen werden als bei den Rötelmäusen (15,1 %) (KOZUCH et al. 1990). Die FSME-Virus Seropositivität von Gelbhalsmäusen, die mit einem VNT getestet wurde, entsprach 3,7 % in Ungarn (ZÖLDI et al. 2015a). Außerdem ergab eine weitere serologische Studie aus der Schweiz eine Seroprävalenz von 1,3 % mit einem IFT bei den untersuchten Gelbhalsmäusen (BURRI et al. 2012). Des Weiteren konnte im Elsass bei 3,3 % der Gelbhalsmäuse Antikörper gegen das FSME-Virus mit einem ELISA nachgewiesen werden (BOURNEZ et al. 2020). Auch der FSME-Virus-Nachweis aus Organen wie Hirn- oder Milzgewebe durch RT-PCR von Gelbhalsmäusen ist bestätigt worden (ACHAZI et al. 2011, PINTÉR et al. 2014). Im Vergleich zu der Rötelmaus hat die Gelbhalsmaus trotz der vielen Studien eine untergeordnete Rolle als Wirt für die systemische FSME-Übertragung (KNAP et al. 2012).

2.2.3 *Sonstige Wirbeltiere*

Neben den vielen Antikörpernachweisen aus Wild- und Haustieren, die für sich genommen wenig über den natürlichen Übertragungsprozess des FSME-Virus aussagen, wurde das Virus in mehreren Säugetierarten und einigen Vogelarten festgestellt (DOBLER et al. 2020). Dennoch heißt ein positiver FSME-Virus-Nachweis nicht, dass der Träger auch gleich Reservoir ist. Nur Wirbeltiere mit Reservoirkompetenz übertragen, sobald sie infiziert sind, ihre Infektion zumindest für einen bestimmten Zeitraum auf saugende Zecken (RUBEL und

SCHIFFNER-ROHE 2019). Tabelle 1 listet die einheimischen Wirbeltierarten auf, die nachweislich oder mit hoher Wahrscheinlichkeit FSME-Viren auf saugende Zecken übertragen. Dies sind ausschließlich kleine bis mittelgroße Säugetiere. Es ist wahrscheinlich, dass das FSME-Virus andere lokale Reservoirwirte hat, wie z.B. bestimmte Vogelarten, aber solche Studiennachweise fehlen (RUBEL und SCHIFFNER-ROHE 2019). Um die tatsächliche Reservoirkompetenz einer Art nachzuweisen, sind Feldversuche unerlässlich (RUBEL und SCHIFFNER-ROHE 2019). Große Säugetiere, wie z.B. Wildschweine oder Rehe, tragen erheblich zur Vermehrung von Vektorzecken bei, indem sie als wichtige Wirte für erwachsene Weibchen fungieren und somit auch die FSME-Virus-Zirkulation beeinflussen (RUBEL und SCHIFFNER-ROHE 2019).

Tabelle 1: Nachgewiesene und vermutete (*) Reservoirwirte des FSME-Virus von mitteleuropäischen Wirbeltieren; modifiziert nach RUBEL und SCHIFFNER-ROHE (2019).

Mammalia: Rodentia (Nagetiere)	
Muridae (Langschwanzmäuse)	
<i>Apodemus agrarius</i> (Brandmaus)	(LABUDA et al. 1993)
<i>Apodemus flavicollis</i> (Gelbhalsmaus)	(RADDA et al. 1969b, LABUDA et al. 1993, LABUDA et al. 1996)
* <i>Apodemus sylvaticus</i> (Waldmaus)	(SONENSHINE und MATHER 1994)
* <i>Mus musculus</i> (Hausmaus)	(RADDA et al. 1964)
* <i>Micromys minutus</i> (Zwergmaus)	(GRULICH et al. 1967)
Gliridae (Bilche)	
* <i>Muscardinus avellanarius</i> (Haselmaus)	(KOZUCH et al. 1963)
* <i>Glis glis</i> (Siebenschläfer)	(NOSEK und GRULICH 1967)
Cricetidae (Wühler)	
* <i>Microtus agrestis</i> (Erdmaus)	(TONTERI et al. 2011)
* <i>Microtus arvalis</i> (Feldmaus)	(KOZUCH et al. 1967)
<i>Microtus subterraneus</i> (Kurzohrmaus)	(LABUDA et al. 1993)
<i>Clethrionomys glareolus</i> (Rötelmaus)	(LABUDA et al. 1993)
Sciuridae (Hörnchen)	
* <i>Sciurus vulgaris</i> (Euras. Eichhörnchen)	(HUBÁLEK und RUDOLF 2012)
Eulipotyphla (Insektenfresser)	
* <i>Erinaceus euopaeus</i> (Westigel)	(LABUDA et al. 1993)

**Erinaceus roumanicus* (Ostigel) (KOZUCH et al. 1967)

**Talpa europaea* (Europäischer Maulwurf) (GRULICH 1960)

Soricidae (Spitzmäuse)

**Sorex araneus* (Waldspitzmaus) (BAKHVALOVA et al. 2016, KOZUCH et al. 1967)

Carnivora (Raubtiere)

Canidae (Hunde)

**Vulpes vulpes* (Rotfuchs) (RADDA 1973)

Mustelidae (Marder)

Mustela putorius (Europäischer Iltis) (RADDA et al. 1969a)

3 Publikation

Seroprevalence of Tick-Borne Encephalitis (TBE) Virus Antibodies in Wild Rodents from Two Natural Foci in Bavaria, Germany

Philipp Johannes Brandenburg ¹, Anna Obiegala ¹, Hannah Maureen Schmuck ¹, Gerhard Dobler ², Lidia Chitimia-Dobler ² and Martin Pfeffer ¹

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

² National Consulting Laboratory for TBE, Bundeswehr Institute of Microbiology, Neuherbergstrasse 11, D-80937 Munich, Germany

MDPI, *Pathogens* **2023**, *12*(2), 185; <https://doi.org/10.3390/pathogens12020185>

Stellungnahme zum Eigenanteil an der Publikation

Das Konzept der Studie wurde von Gerhard Dober und Martin Pfeffer als Teilprojekt des Vernetzungsprojektes „Tick-Borne Encephalitis in Germany“ (TBENAGER) entwickelt. Von 2019 bis Juni 2020 wurden die Nagetierfänge mit der Probenentnahme von Hannah Maureen Schmuck durchgeführt, welche von mir ab Juli 2020 bis 2022 weitergeführt wurden. Gerhard Dobler und Lidia Chitimia-Dobler halfen mir bei der labordiagnostischen Untersuchung der Proben am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München. Die statistische Auswertung erfolgte durch Anna Obiegala und mich. Anna Obiegala, Martin Pfeffer und Gerhard Dobler unterstützten mich bei der Auswertung der Ergebnisse. Die Literaturrecherche erfolgte durch Anna Obiegala und mich. Das Manuskript wurde unter Anleitung von Anna Obiegala und Martin Pfeffer selbstständig durch mich verfasst und in Zusammenarbeit mit allen Koautoren fertig gestellt. Es wurden keine weiteren als die angegebenen Quellen verwendet.

Article

Seroprevalence of Tick-Borne Encephalitis (TBE) Virus Antibodies in Wild Rodents from Two Natural TBE Foci in Bavaria, Germany

Philipp Johannes Brandenburg ^{1,*}, Anna Obiegala ¹, Hannah Maureen Schmuck ¹, Gerhard Dobler ², Lidia Chitimia-Dobler ² and Martin Pfeffer ¹

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

² National Consulting Laboratory for TBE, Bundeswehr Institute of Microbiology, Neuherbergstrasse 11, 80937 Munich, Germany

* Correspondence: philipp.brandenburg@vetmed.uni-leipzig.de; Tel.: +49-341-97-38150

Abstract: Tick-borne encephalitis (TBE) is Eurasia's most important tick-borne viral disease. Rodents play an important role as natural hosts. Longitudinal studies on the dynamics of the seroprevalence rates in wild rodents in natural foci over the year are rare, and the dynamics of the transmission cycle still need to be understood. To better understand the infection dynamics, rodents were captured in a capture-mark-release-recapture-study in two natural foci in Bavaria, Germany, monthly from March 2019 to October 2022. Overall, 651 blood and thoracic lavage samples from 478 different wild rodents (*Clethrionomys glareolus* and *Apodemus flavicollis*) were analyzed for antibodies against tick-borne encephalitis virus (TBEV) by indirect immunofluorescence assay (IIFA) and confirmed using a serum neutralization test (SNT). Furthermore, a generalized linear mixed model (GLMM) analysis was performed to investigate ecological and individual factors for the probability of infection in rodents. *Clethrionomys glareolus* (19.4%) had a higher seroprevalence than *A. flavicollis* (10.5%). Within *Cl. glareolus*, more males (40.4%) than females (15.6%) were affected, and more adults (25.4%) than juveniles (9.8%). The probability of infection of rodents rather depends on factors such as species, sex, and age than on the study site of a natural focus, year, and season. The high incidence rates of rodents, particularly male adult bank voles, highlight their critical role in the transmission cycle of TBEV in a natural focus and demonstrate that serologically positive rodents can be reliably detected in a natural focus regardless of season or year. In addition, these data contribute to a better understanding of the TBEV cycle and thus could improve preventive strategies for human infections.

Keywords: *Clethrionomys glareolus*; *Apodemus flavicollis*; epidemiology; tick-borne encephalitis; seroprevalence



Citation: Brandenburg, P.J.; Obiegala, A.; Schmuck, H.M.; Dobler, G.; Chitimia-Dobler, L.; Pfeffer, M. Seroprevalence of Tick-Borne Encephalitis (TBE) Virus Antibodies in Wild Rodents from Two Natural TBE Foci in Bavaria, Germany. *Pathogens* **2023**, *12*, 185. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020185>

Academic Editor: Anna Moriuszko-Malinowska

Received: 30 December 2022

Revised: 17 January 2023

Accepted: 23 January 2023

Published: 25 January 2023



Copyright: © 2023 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Tick-borne encephalitis virus (TBEV), belonging to the genus *Flavivirus* within the family *Flaviviridae*, is considered to be the most relevant tick-borne pathogen in Eurasia causing tick-borne encephalitis (TBE) [1–3]. Since 2012, TBE has been a notifiable disease in the European Union (EU) [4], resulting in over 15,000 registered human cases with an increasing incidence in the EU and the European Economic Area (EEA) between 2016 and 2020, with the highest number of confirmed cases reported in Czechia, Lithuania, and Germany [5]. In the year 2020, over 700 human cases were seen in Germany. Since then, the Robert Koch Institute (RKI) has expanded the number of risk areas to 175 in 2022. Risk areas are defined by the number of TBE cases reported in at least one of the 16 five-year periods from 2002–2021 in a district or district region (consisting of the district affected plus all neighboring districts) in comparison to the number of cases expected at an incidence of one disease per 100,000 inhabitants [6]. TBEV is divided into three genetic subtypes: the European (TBEV-Eur), the Far-Eastern (TBEV-FE), and the Siberian subtype (TBEV-Sib),

with at least four other proposed subtypes: two Baikalian (TBEV-Bkl-1, TBEV-Bkl-2), the Himalayan (TBEV-Him) and the Obskaya subtype (TBEV-Ob) [7]. Most human infections with TBEV are asymptomatic. However, TBE can also manifest as fevers, acute progressive encephalitis, and debilitating neurological sequelae, and in less than 2% of cases, to death. TBEV thus has a significant impact on human health in endemic regions, including Central and Eastern Europe, Siberia, far-eastern Russia, northern China, and Japan [8–10].

All subtypes of TBEV are maintained in complex natural endemic transmission cycles, so-called microfoci with an average size of about 0.5–1 ha [11], involving ticks as natural vectors. In Central Europe, *Ixodes ricinus* ticks are the main vectors transmitting the European subtype to naïve hosts through blood meals after becoming infected with TBEV when feeding on a viremic host or co-feeding with an infected tick in close proximity to a non-viremic host [2,12,13]. In addition, they serve as a virus reservoir through transstadial and transovarial transmission within tick populations [14]. The main natural mammalian hosts of TBEV are rodents, in particular, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) and the yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*) [3,12]. In endemic areas, recent studies propose a long-lasting or persistent infection in rodents [15,16] and the possible transmission of TBEV to their offspring via maternal milk, as described in a human case study [17]. In experimentally TBEV-infected voles, the virus persisted for more than three months in multiple organs and for 50 days in the blood, analyzed with real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) [18]. Humans become infected with TBEV via tick bite, through the consumption of infected unpasteurized milk or such milk products, or, in rare cases, through organ transplants [3,19].

Recent studies have highlighted the key role of voles as reservoir hosts for TBEV in natural foci. In several studies from Hungary, Slovenia, and the Czech Republic, the prevalence of TBEV in small mammals was monitored using different methods such as PCR, indirect immunofluorescent assay (IIFA), or serum neutralization test (SNT) [20–22]. In general, TBEV RNA can be detected by RT-qPCR during the viremic stage in several organs of the bank vole with the highest rates in whole blood, brain, and spine samples [23]. A comparative study of bank voles showed that thoracic lavage samples, in principle, allow the detection of neutralizing antibodies but showed a reduced sensitivity in comparison to serum samples. Therefore, the examination of thoracic lavage samples is also suitable if no serum sample is available [24]. In addition, the important significance of rodents, especially the bank vole, as part of the transmission cycle of TBEV was confirmed in the past decades. However, there is still a gap in our knowledge about the dynamics of the TBEV infection in a rodent population of a distinct TBE microfoci, i.e., the changing TBEV seroprevalence in rodents over a continuous period, the persistence of antibodies in rodents in nature, and demographic factors such as trapping location, year, season, species, age, and sex and their influence on the infection probability of the rodents in natural TBEV foci. Better knowledge of the transmission dynamics of the TBEV in foci might also help to predict periods with high TBEV prevalence in nature and, therefore, higher risk periods for infections in humans. Studies in the past have only partially addressed these questions. Field studies from TBEV natural foci in Hungary, Poland, and France have come to inconclusive results. They describe factors such as year, location, species, and age as having a possible influence on the TBEV prevalence in rodents, whereas season and sex of rodents had no influence [22,25,26]. However, these factors mentioned above have not yet been investigated together yet.

In the presented four-year study from 2019–2022, the wild rodent population from two well-described TBEV natural foci located in Bavaria, Germany, were serologically monitored for TBEV antibodies using a capture-recapture method to obtain data on the seasonal dynamics and to gain greater insight into the local ecology of TBEV transmission.

2. Results

2.1. Small Mammal Trapping

Overall, 706 captures of small rodents were documented (Table 1), corresponding to 500 different individuals (predominantly *Cl. glareolus*, $n = 349$, 69.8%, followed by

A. flavicollis, $n = 151$, 30.2%). Furthermore, 100 individuals were re-captured 128 times within the two trapping nights of one trapping session, indicating no big harm for the animals to be trapped, chipped, and released again. Over the four years, the annual number of individually trapped bank voles and yellow-necked mice peaked in 2019 (*Cl. glareolus*, $n = 189$; *A. flavicollis*, $n = 87$), dropped in 2020 (*Cl. glareolus*, $n = 99$; *A. flavicollis*, $n = 18$), and decreased further in the two following years 2021 (*Cl. glareolus*, $n = 47$; *A. flavicollis*, $n = 35$), and 2022 (*Cl. glareolus*, $n = 31$; *A. flavicollis*, $n = 13$) (Figure 1). In the year 2019 (445 individuals/0.5 ha), the density of small mammals peaked during summer (June–August). In 2020 (189 individuals/0.5 ha) and 2021 (132 individuals/0.5 ha), the highest density was recorded in autumn (September and October), whereas in 2022 (71 individuals/0.5 ha), the density peaked again in summer. In every year and season, the density of *Cl. glareolus* was higher in comparison to *A. flavicollis*, except for autumn 2021 (Figure 1).

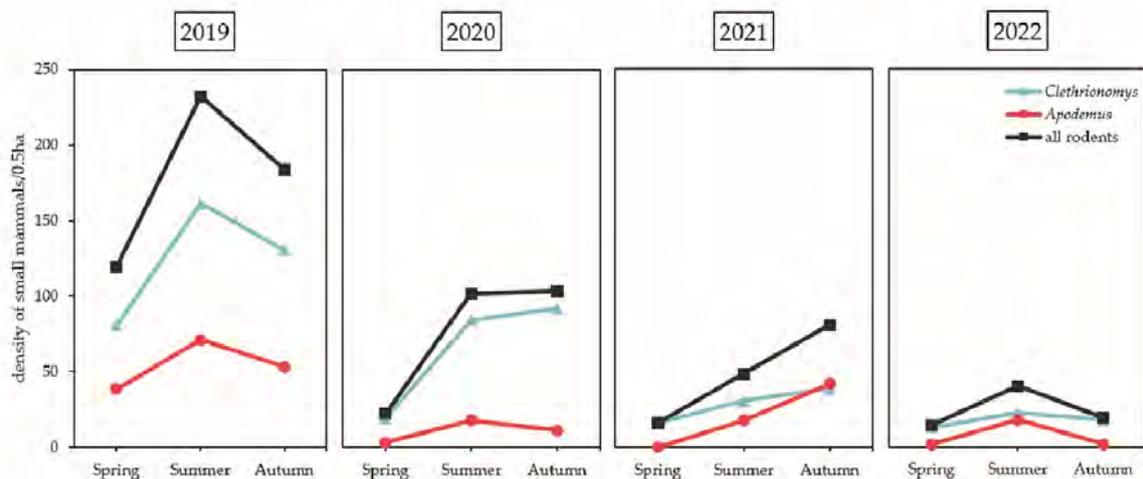


Figure 1. Calculation of the density in Haselmuehl and Heselbach for two species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) and yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*), per season and year. Density represents the minimum number alive (MNA) per season of captured rodents per 0.5 hectares. Spring (March–May), summer (June–August), autumn (September–October).

In total, 150 (30.0%) rodents were re-captured at two trapping sessions, and from these, 56 (11.2%) were even re-captured at a third trapping session. Overall, 19 (3.8%) rodents (17 *Cl. glareolus* and two *A. flavicollis*) were captured during two different years, with the longest period of 11 months between the trapping sessions (first capture July 2019 respectively June 2020, the last capture June 2020 and May 2021), and the shortest period of 5 months (first capture October 2019, last capture March 2020). The average period of rodents captured in two different years was 7.4 months. The proportion of rodents captured during two different years was 4.3% in 2020 ($n = 12$), and for the two following years, 3.8% in 2021 ($n = 4$) and 2022 ($n = 3$).

Table 1. Tick-borne encephalitis virus seropositivity rates for rodents by years, seasons, and locations. Serum and thoracic lavage samples are considered together.

Year	Season	NTR	Haselmuehl						Heselbach								
			<i>Clethrionomys glareolus</i>			<i>Apodemus flavicollis</i>			<i>Clethrionomys glareolus</i>			<i>Apodemus flavicollis</i>					
			Seropos. (Seropos./ Sampled Rodents)	RF (%)		NTR	Seropos. (Seropos./ Sampled Rodents)	RF (%)		NTR	Seropos. (Seropos./ Sampled Rodents)	RF (%)		NTR	Seropos. (Seropos./ Sampled Rodents)	RF (%)	
	Y	S		Y	S		Y	S		Y	S		Y	S			
2019	Spring	34	7/30		23.3	11	0/10	0	0	28	7/26		26.9	13	4/10		40.0
	Summer	72	14/59	21.3	23.7	12	0/11	0	0	49	5/32	18.0	15.6	38	8/33	22.6	24.2
	Autumn	52	9/52		17.3	17	0/17	0	0	42	6/42		14.3	21	2/19		10.5
2020	Spring	0	0/0		0	0	0/0	0	0	7	3/7		42.9	0	0/0		0
	Summer	19	2/19	10.8	10.5	5	0/5	0	0	49	14/44	23.9	31.8	11	3/11	20.0	27.3
	Autumn	19	2/18		11.1	3	0/2	0	0	41	5/41		12.2	4	0/4		0
2021	Spring	2	0/2		0	0	0/0	0	0	11	4/11		36.4	0	0/0		0
	Summer	2	1/2	17.6	50.0	1	0/1	5.6	0	22	3/22	18.8	13.6	11	0/11	0	0
	Autumn	13	2/13		15.4	17	1/17		5.9	15	2/15		13.3	16	0/16		0
2022	Spring	6	0/6		0	0	0/0	0	0	3	0/3		0	1	0/1		0
	Summer	9	5/9	33.3	55.6	1	0/1	0	0	6	0/6	0	0	11	1/11	7.7	9.1
	Autumn	0	0/0		0	0	0/0	0	0	11	0/11		0	1	0/1		0
Total		228	42/210	20.0		67	1/64	1.6		284	49/260	18.8		127	18/117	15.4	

Y = Year; S = Season; NTR = Number of trapped rodents; Seropos. = Seropositivity; seropos. = seropositive; RF = Relative frequency.

2.2. TBEV Seroprevalence in Small Mammals

We examined 420 serum samples (first capture: $n = 280$; second capture: $n = 95$; third capture: $n = 45$) as well as 50 thoracic lavage samples (first capture: $n = 38$; second capture: $n = 11$; third capture: $n = 1$) from 338 *Cl. glareolus* and 167 serum samples (first capture: $n = 128$; second capture: $n = 29$; third capture: $n = 10$) along with 14 thoracic lavage samples (first capture: $n = 11$; second capture: $n = 3$) from 140 *A. flavicollis*. Each serum and thoracic lavage sample belonged to different rodents, captured at one to three trapping sessions. Overall, 16.9% (95% CI: 13.8–20.6%, $n = 81$) of individuals, as well as 16.9% (95% CI: 14.2–20.0%, $n = 110$) of all tested samples were seropositive for TBEV antibodies. The proportion of seropositive individuals for *A. flavicollis* was 11.4% (95% CI: 7.1–17.9%, $n = 16$), and for *Cl. glareolus*, 19.2% (95% CI: 15.4–23.8%, $n = 65$). The proportion of entire seropositive samples was significantly higher in *Cl. glareolus* (19.4%, 95% CI: 16.0–23.2%, $n = 91$) compared to *A. flavicollis* (10.5%, 95% CI: 6.8–15.9%, $n = 19$) (Table 1) looking at the GLMM (p -value = 0.0005). The GLMM confirmed this effect on the individual infection probability by small mammal species for the location Haselmuehl (p -value = 0.0011) but not for the location Heselbach (p -value = 0.4047) (Table 2). The proportion of seropositivity did not differ significantly between years when looking at post hoc analysis (p -value = 0.361–0.986), varying from 11.8% (95% CI: 6.9–19.3%, $n = 13$) in 2021 to 19.2% (95% CI: 13.7–26.3%, $n = 29$) in 2020. Seroprevalence levels did differ significantly between summer (20.2%, 95% CI: 15.9–25.4%, $n = 56$) and autumn (10.8%, 95% CI: 7.6–15.2%, $n = 29$) (p -value = 0.0185) but looking at the post hoc analysis it was not significant for *A. flavicollis* (p -value = 0.278–0.879) and *Cl. glareolus* (p -value = 0.198–0.996). Consequently, spring, summer, and autumn seasons had no significant effect on the infection probability in small mammals (Tables 2 and 3). TBEV antibodies were detected from spring to autumn in each year examined, except for the spring and autumn of 2022 (Table 1). Further, the GLMM showed that there were no differences in prevalence between small mammals from Haselmuehl (15.7%, 95% CI: 11.8–20.5%, $n = 43$) and Heselbach (17.8%, 95% CI: 14.2–22.0%, $n = 67$) (p -value = 0.2211) (Tables 2 and 3). Seropositivity of sexes did differ significantly in the GLMM between female *A. flavicollis* (18.5%, 95% CI: 10.7–29.7%, $n = 12$) and male (7.1%, 95% CI: 3.0–14.8%, $n = 6$) (p -value = 0.0376). In *Cl. glareolus*, a significantly higher proportion of seropositivity was observed in males (40.4%, 95% CI: 31.8–49.5%, $n = 46$) than in females (15.6%, 95% CI: 10.9–21.8%, $n = 27$) (p -value = 2.43×10^{-6}) (Tables 2 and 3). Adult *A. flavicollis* (12.0%, 95% CI: 7.6–18.3%, $n = 18$) showed a significantly higher seroprevalence than juvenile (3.2%, 95% CI: 0.0–17.6%, $n = 1$) (p -value = 0.0374). In the GLMM for *Cl. glareolus*, the factors of age and sex correlate with each other, which is why both must be considered individually. As with *A. flavicollis*, adult *Cl. glareolus* (25.4%, 95% CI: 20.7–30.8%, $n = 73$) showed a significantly higher seroprevalence than juvenile (9.8%, 95% CI: 6.2–15.1%, $n = 18$) (p -value = 0.0004) (Tables 2 and 3).

Table 2. Results of a generalized linear mixed model with binominal error distribution with effects of location, seasonality, small mammal species, sex, and age on infection probability in small mammal specimens in total, per location and species.

Factor	Estimate	Std. Error	z-Value	p-Value
Total				
Intercept	−2.9372	0.3989	−7.363	1.8×10^{-13} ***
<i>A. flavicollis</i> v. <i>Cl. glareolus</i>	1.0603	0.3037	3.491	0.000481 ***
Autumn v. spring	0.6671	0.3517	1.897	0.057849 .
Autumn v. summer	0.6463	0.2745	2.355	0.018545 *
Haselmuehl v. Heselbach	0.2883	0.2356	1.224	0.221094
2019 v. 2020	−0.1045	0.2798	−0.374	0.708743
2019 v. 2021	−0.5708	0.3552	−1.607	0.108080
2019 v. 2022	−0.7571	0.4762	−1.590	0.111845
Adult v. juvenile	−0.6716	0.3426	−1.960	0.049969 *

Table 2. Cont.

Factor	Estimate	Std. Error	z-Value	p-Value
Female v. male	0.8102	0.2509	3.229	0.001240 **
Haselmuehl				
Intercept	−5.88806	1.16148	−5.069	3.99×10^{-7} ***
Autumn v. spring	0.04609	0.58515	0.079	0.93722
Autumn v. summer	0.54246	0.43445	1.249	0.21181
<i>A. flavicollis</i> v. <i>Cl. glareolus</i>	3.44187	1.05740	3.255	0.00113 **
2019 v. 2020	−0.65451	0.61951	−1.056	0.29074
2019 v. 2021	0.51385	0.66947	0.768	0.44276
2019 v. 2022	0.09561	0.68152	0.140	0.88843
Adult v. juvenile	0.41223	0.51703	0.797	0.42528
Female v. male	2.11164	0.47819	4.416	1.01×10^{-5} ***
Heselbach				
Intercept	−1.73161	0.49816	−3.476	0.000509 ***
Autumn v. spring	1.30624	0.44224	2.954	0.003140 **
Autumn v. summer	0.81817	0.37229	2.198	0.027974 *
<i>A. flavicollis</i> v. <i>Cl. glareolus</i>	0.28740	0.34491	0.833	0.404698
2019 v. 2020	0.23872	0.35038	0.681	0.495677
2019 v. 2021	−0.78207	0.43313	−1.806	0.070976
2019 v. 2022	−2.01711	1.04650	−1.927	0.053920 .
Adult v. juvenile	−1.31092	0.44867	−2.922	0.003480 **
Female v. male	0.09002	0.31743	0.284	0.776736
<i>Apodemus flavicollis</i>				
Intercept	−3.9593	1.1871	−3.335	0.000852 ***
Autumn v. spring	1.4047	0.9242	1.520	0.128515
Autumn v. summer	1.0298	0.7217	1.427	0.153607
Haselmuehl v. Heselbach	2.7111	1.0687	2.537	0.011184 *
2019 v. 2020	−0.5673	0.7925	−0.716	0.474066
2019 v. 2021	−1.8405	1.1040	−1.667	0.095504
2019 v. 2022	−1.7362	1.1382	−1.525	0.127161
Adult v. juvenile	−2.3298	1.1194	−2.081	0.037411 *
Female v. male	−1.2373	0.5951	−2.079	0.037597 *
<i>Clethrionomys glareolus</i>				
Intercept	−1.935855	0.330835	−5.851	4.87×10^{-9} ***
Autumn v. spring	0.524291	0.361727	1.449	0.1472
Autumn v. summer	0.494920	0.288599	1.715	0.0864
Haselmuehl v. Heselbach	−0.084538	0.266944	−0.317	0.7515
2019 v. 2020	0.001682	0.310668	0.005	0.9957
2019 v. 2021	−0.268220	0.399430	−0.672	0.5019
2019 v. 2022	−0.796784	0.540969	−1.473	0.1408
Female v. male	1.363863	0.289338	4.714	2.43×10^{-6} ***

Std. Error = Standard Error; v. = versus; Significance codes: 0 '***' = extremely significant; 0.001 '**' = highly significant; 0.01 '*' = very significant; 0.05 '.' = significant.

In total, 81 individuals were seropositive in at least one trapping session. Among them, 13 seroconversions were observed (four re-captured once positive), 12 seropositive rodents were re-captured once positive, and seven were re-captured twice positive. Among the seropositive recaptures, TBEV antibodies were detected in a maximal period of 189 days for *Cl. glareolus* and 69 days for *A. flavicollis*. Three seropositive rodents were tested seronegative at the time of recapture (36–107 days between captures) (Table 4).

Table 3. The number of tick-borne encephalitis virus seropositive rodents of total sampled by years, seasons, and locations. Serum and thoracic lavage samples are considered together.

		TBEV Seropositive/Sampled Rodents																	
		Haselmuehl							Heselbach										
		<i>Clethrionomys glareolus</i>			<i>Apodemus flavicollis</i>				<i>Clethrionomys glareolus</i>			<i>Apodemus flavicollis</i>							
Year	Season	M	F	Juv.	M	F	Juv.	Total	Seropos. (%)		M	F	Juv.	M	F	Juv.	Total	Seropos. (%)	
									Y	S								Y	S
2019	Spring	3/5	2/19	2/6	0/8	0/2	0/0	7/40		17.5	2/7	5/16	0/3	1/2	3/5	0/3	11/36		30.6
	Summer	9/15	2/17	3/27	0/7	0/4	0/0	14/70	16.8	20.0	3/5	0/11	2/16	3/18	4/8	1/7	13/65	19.8	20.0
	Autumn	3/13	1/14	5/25	0/8	0/8	0/1	9/69		13.0	1/6	3/12	2/24	2/10	0/6	0/3	8/61		13.1
2020	Spring	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		0	1/4	0/0	2/3	0/0	0/0	0/0	3/7		42.9
	Summer	2/3	0/15	0/1	0/1	0/4	0/0	2/24	9.1	8.3	8/13	6/19	0/12	0/3	3/7	0/1	17/55	23.4	30.9
	Autumn	1/3	0/8	1/7	0/1	0/1	0/0	2/20		10.0	3/8	1/8	1/25	0/3	0/1	0/0	5/45		11.1
2021	Spring	0/0	0/0	0/2	0/0	0/0	0/0	0/2		0	0/5	4/6	0/0	0/0	0/0	0/0	4/11		36.4
	Summer	1/1	0/1	0/0	0/0	0/1	0/0	1/3	11.4	33.3	2/10	1/6	0/6	0/6	0/4	0/1	3/33	12.0	9.1
	Autumn	1/1	1/4	0/8	0/5	1/3	0/9	3/30		10.0	2/3	0/3	0/9	0/8	0/4	0/4	2/31		6.5
2022	Spring	0/4	0/2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/6		0	0/2	0/1	0/0	0/0	0/1	0/0	0/4		0
	Summer	4/4	1/5	0/0	0/0	0/1	0/0	5/10	31.3	50.0	0/1	0/2	0/3	0/4	1/5	0/2	1/17	3.0	5.9
	Autumn	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		0	0/1	0/4	0/6	0/1	0/0	0/0	0/12		0
Total		24/49	7/85	11/76	0/30	1/24	0/10	43/274			22/65	20/88	7/107	6/55	11/41	1/21	67/377		
Seropos. (%)		49.0	8.2	14.5	0	4.2	0	15.7			33.8	22.7	6.5	10.9	26.8	4.8	17.8		

Y = Year; S = Season; M = Male; F = Female; Juv. = Juvenile; Seropos. = Seropositivity.

Table 4. Listing of seropositive rodents which were caught at least two times with the results of the indirect immunofluorescence assay (IIFA).

ID	Species	Sex	First Capture		Days upon 2nd Capture	Second Capture		Days upon 3rd Capture	Third Capture	
			Sample	IIFA		Sample	IIFA		Sample	IIFA
Seroconversion										
35_Heb	<i>Cl. glareolus.</i>	f	serum	neg.	42	serum	pos.			
26_Heb	<i>Cl. glareolus</i>	f	serum	neg.	43	lavage	pos.			
31_Heb	<i>Cl. glareolus</i>	f	serum	neg.	42	lavage	pos.			
220_Heb	<i>Cl. glareolus</i>	f	serum	neg.	293	serum	pos.			
169_Heb	<i>A. flavicollis</i>	m	serum	neg.	59	serum	pos.			
250_Heb	<i>A. flavicollis</i>	f	serum	neg.	308	lavage	pos.			
224_Heb	<i>Cl. glareolus</i>	f	serum	neg.	47	serum	neg.	142	serum	pos.
194_Heb	<i>Cl. glareolus</i>	m	n.a.	n.a.	23	serum	neg.	293	serum	pos.
222_Heb	<i>Cl. glareolus</i>	m	serum	neg.	47	serum	neg.	246	serum	pos.
59_Ham	<i>Cl. glareolus</i>	m	serum	neg.	48	serum	pos.	36	serum	pos.
297_Heb	<i>Cl. glareolus</i>	f	serum	neg.	294	serum	pos.	37	serum	pos.
275_Heb	<i>A. flavicollis</i>	f	serum	neg.	244	serum	pos.	20	serum	pos.
465_Ham	<i>Cl. glareolus</i>	m	serum	neg.	62	serum	pos.	29	serum	pos.
Positive recaptured once										
20_Ham	<i>Cl. glareolus</i>	m	serum	pos.	92	serum	pos.			
21_Ham	<i>Cl. glareolus</i>	m	serum	pos.	92	serum	pos.			
146_Ham	<i>Cl. glareolus</i>	m	serum	pos.	59	serum	pos.			
84_Ham	<i>Cl. glareolus</i>	m	serum	pos.	92	serum	pos.			
105_Ham	<i>Cl. glareolus</i>	f	serum	pos.	59	serum	pos.			
232_Heb	<i>Cl. glareolus</i>	f	serum	pos.	48	serum	pos.			
388_Heb	<i>Cl. glareolus</i>	m	serum	pos.	29	serum	pos.			
426_Heb	<i>Cl. glareolus</i>	m	serum	pos.	30	serum	pos.			
290_Heb	<i>Cl. glareolus</i>	f	serum	pos.	17	serum	pos.			
261_Heb	<i>Cl. glareolus</i>	m	serum	pos.	141	serum	pos.			
283_Heb	<i>Cl. glareolus</i>	f	serum	pos.	17	lavage	pos.			
Positive recaptured twice										
16_Ham	<i>Cl. glareolus</i>	f	serum	pos.	42	n.a.	n.a.	50	serum	pos.
9_Ham	<i>Cl. glareolus</i>	m	serum	pos.	91	serum	pos.	36	serum	pos.

Table 4. Cont.

ID	Species	Sex	First Capture		Second Capture			Third Capture		
			Sample	IIFA	Days upon 2nd Capture	Sample	IIFA	Days upon 3rd Capture	Sample	IIFA
80_Heb	<i>Cl. glareolus</i>	m	serum	pos.	33	serum	pos.	59	serum	pos.
232_Heb	<i>Cl. glareolus</i>	f	serum	pos.	47	serum	pos.	142	serum	pos.
294_Heb	<i>Cl. glareolus</i>	m	serum	pos.	15	serum	pos.	21	serum	pos.
305_Heb	<i>Cl. glareolus</i>	m	serum	pos.	20	serum	pos.	36	serum	pos.
385_Heb	<i>Cl. glareolus</i>	f	serum	pos.	36	serum	pos.	28	serum	pos.
77_Heb	<i>A. flavicollis</i>	f	serum	pos.	33	serum	pos.	36	serum	pos.
Seropositive to seronegative captures										
189_Ham	<i>Cl. glareolus</i>	f	n.a.	n.a.	23	serum	pos.	48	serum	neg.
136_Heb	<i>A. flavicollis</i>	m	serum	pos.	36	lavage	neg.			
69_Heb	<i>A. flavicollis</i>	m	serum	pos.	16	n.a.	n.a.	91	serum	neg.

n.a. = not available (due to weakened physical conditions or the body weight was under 14 g); pos. = positive; neg. = negative.

2.3. Movement Profile of the Recaptured Small Mammals

In the sub-plot Ham1 (size of 333 m²), 42 *Cl. glareolus* and six *A. flavicollis* were recaptured; in Ham2 (size of 366 m²), 28 *Cl. glareolus* and 13 *A. flavicollis* were recaptured; in Ham3 (size of 480 m²), 48 *Cl. glareolus* and four *A. flavicollis* were recaptured. In the sub-plot Heb1 (size of 330 m²), 26 *Cl. glareolus* and 23 *A. flavicollis* were recaptured, and in Heb2 (size of 1584 m²), 95 *Cl. glareolus* and 49 *A. flavicollis* were recaptured (Figure 2). In total, 141 recaptures were counted for the study site of Haselmuehl and 193 for the study site of Heselbach. Recapture has never occurred in two different sub-plots. Within the sub-plots, the range of movement was distributed over the entire sub-plot.



Figure 2. Overview of the sampling site in Haselmuehl with three sub-plots (Ham1–Ham3) (a) and Heselbach with two sub-plots (Heb1 and Heb2) (b); each white dot represents one live animal trap. The image was created by using Google Earth Pro, Map: Google Earth ©2022 Google, Image Landsat/Copernicus ©2022 GeoBasis-DE/BKG.

3. Discussion

This four-year study increases our knowledge of the seasonal and interannual dynamics of TBEV circulation in small mammals in two active natural TBE microfoci and provides additional information on demographic host factors influencing TBEV infection on an individual level. Our results confirm an active circulation of TBEV in rodents of at least two different species in two natural TBE foci. This study is the first to examine small mammals for the dynamics of TBEV antibodies over four years in Germany. The two TBE foci, Haselmuehl and Heselbach, were identified as TBE microfoci after residents near the foci developed clinical TBE symptoms. Since 2009 TBEV was continuously detected

in questing ticks in these foci [27,28]. Both sites are located in one of the most severely TBE-affected areas in Germany, with the highest incidence rates in the current five-year period (2017–2021) with a total of 115 reported human cases in both districts combined [29].

Apodemus flavicollis and *Cl. glareolus* densities (71–445 individuals/year/0.5 ha) at those sites were investigated in the current study and were comparable to densities from a TBEV seroprevalence study in Hungary (78–165 individuals/year/0.5 ha) [30] and substantially higher than data from France (4–57 individuals/year/0.5 ha) [27]. The abundant food supply of fruits and fungi via seeds from seed-rich trees in an area is essential to maintain rodent population densities [31]. These environmental conditions seemed to be adequate in our study areas to maintain stable rodent populations over the study period. To successfully circulate TBEV in nature, the virus requires an area with dense rodent and tick populations and woodlands with dense understory cover, which are present at both study sites [27,32].

For the continuous detection of TBE infection in rodents, serological test systems are usually the methods of choice as virus detection by PCR or virus isolation usually needs organ material which causes the death of the animal. The SNT is considered the most specific serological test; however, it needs to work with live viruses under BSL-3 laboratory conditions [33]. Whereas methods such as the IIFA, which we mainly used in our study, were shown to reach a sensitivity of almost 80% and a specificity of nearly 99% compared to the neutralization test (NT) when tested with dog sera [34] such comparative studies in sera from wild rodents are missing. Possible cross-reactions with other flaviviruses, such as West Nile virus or Louping-ill virus, are negligible since rodents are not natural reservoirs in the enzootic cycles of these viruses and are not known to be prevalent in the study areas [35]. We took the opportunity to test if the IIFA may be a suitable alternative for the detection of antibodies against TBEV in small mammals. Therefore, all thoracic lavage samples from the years 2019–2022 that had tested positive using IIFA were verified by SNT and showed a sensitivity of 94.3% compared to SNT results. There is a possibility that specific TBEV antibodies may be detected by IIFA that do not show neutralizing activity and therefore are not detected by NT, which could explain the slightly lower detection rate [34].

In our study, TBEV antibodies were detected in 16.9% of the investigated samples. The seroprevalence in the current study is higher than that observed in studies in Northern and Central Europe that have also examined rodent samples serologically using IIFA. In two natural foci in Finland, a seroprevalence of 4.0% was found [15], while nationwide studies from Slovenia [21], Germany [18], and Switzerland [36] showed seroprevalences of 5.9%, 10.2%, and 3.6%, respectively. Other serological studies using different testing methods from natural foci in Western and Central Europe published seroprevalences of 5.1% in Hungary [30], 14.8% in Poland [25], 1.5% in the Czech Republic [37], 7.0% and 14.6%, respectively, in Slovakia [38,39], 4.2% in France [26], and 14.0% in Bavaria, Germany [40], while a study from Eastern Europe in Russia described a seroprevalence of 61.4% in small mammals in a study area with occurrences of the TBEV-FE, and the TBEV-Sib which may explain this high prevalence [16]. Concerning the seroprevalence rates, our results are to be classified for the bank vole (19.4%) in the highest prevalence range within Europe (2.2% to 20.5%) [15,18,21,22,25,26,36–40], with for example, 14.3% in Slovenia [21], 5.3% in Switzerland [36]. For the yellow-necked mouse (10.5%), the prevalence varies in the middle range (1.3% to 18.1%) [18,21,22,26,36–40], with, for example, 4.0% in Slovenia [21] and 18.1% in Slovakia [39].

In Haselmuehl, yellow-necked mice seem to play a minor contribution to TBEV circulation (1.6%). In Heselbach, seropositive, yellow-necked mice were found only in 2019 (22.6%) and 2020 (20.0%), but none at all in 2021, and only one individual in summer 2022 (7.7%), which is indicative of a subordinate role concerning the circulation of the virus within the natural foci studied for this rodent species. Similar background positivity for *A. flavicollis* was described in Hungary (3.7%) [22] and in Switzerland (1.3%) [36]. The fact that the TBEV prevalence is higher in bank voles has also been pointed out earlier [15,18,21,25]. A study from France described a significantly higher tick load on

A. flavicollis compared to *Cl. glareolus* [26], which may develop resistance to feeding ticks after repeated infestations through the involvement of T-helper cells in the immune response. Furthermore, due to the larger body surface, *A. flavicollis* seem to be more susceptible to tick infestation [41]. This finding should lead to a higher prevalence of *A. flavicollis*. Yet, evidence of stronger viremia, higher antibody titers, and a longer half-life of TBEV antibodies in *Cl. glareolus* compared to *Apodemus* species disproved these assumptions, presumably due to immune response characteristics to TBEV infection [21,42–44]. Thus, the above-shown data indicate that *Cl. glareolus* is more significant compared to *A. flavicollis* for a systemic transmission of TBEV.

Another finding of our study was that within the species *Cl. glareolus*, a significantly larger number of males (40.4%) were seropositive compared to females (15.6%). One reason for this could be the larger territories of male bank voles and, thereby, the possible increased contact with a higher number of ticks in the vegetation [22,45]. Due to high testosterone levels, sexually active bank voles also exhibit reduced innate and acquired immunity, allowing more ticks to be collected and increasing the transmission probability of TBEV [46].

Host age also plays a vital role in our study, which significantly affects the seroprevalence of TBEV in rodents. This observation was also confirmed by other studies in Hungary and Poland [22,25]. During the period of investigation, the seroprevalence of the virus was higher among adult bank voles and yellow-necked mice (25.4%, respectively 12.0%) compared to juvenile individuals (9.8%, respectively 3.2%). Also, in Hungary and Poland, more adult bank voles (25.9%, respectively, 20.8%) were seropositive compared to juveniles (8.3%, respectively 8.7%) [22,25]. The likelihood and possibilities of parasitic infestation increase with host age [47]. In addition, seroprevalence increases with age because antibodies have been detected over a long period (189 days). Nevertheless, these results must be interpreted with caution since we used only weight as a parameter for age classification and had three individuals that were seronegative when recaptured but seropositive before. Another limitation of the study is that we also cannot clarify by the study design whether seropositivity is maintained by a single TBEV infection or by recurrent bites of infected ticks.

From 2019–2022, we did not detect significant annual or seasonal differences in TBEV seroprevalence in rodents, although the density of small mammals has decreased over the years. A higher seroprevalence could be expected in years with fewer rodents. Thus, an increased tick load per individual, which did not occur as described in France, where a total of 541 small mammals were sampled in 2012, 36 in 2013, and 87 in 2014, and the seroprevalence had dropped from 3.5% to 1.1%. In contrast, the tick infestation rate on rodents increased from 38.2% to 83.3% over the years [26,36]. It is known that antibodies against TBEV are detectable in the blood of rodents after 5 days post-infection [18,23]. In several studies, TBEV antibodies were detected up to 100–168 days after infection [18,48]. In our study, all but three rodents tested seropositive continuously in re-captures with the longest period of up to 189 days, indicating a very long circulation period of TBEV antibodies. The fact that two of the three rodents shown to have converted from seropositive to seronegative during recaptures were *A. flavicollis*, and the detection period of seropositivity was shorter than that of *Cl. glareolus* may also be a reason for the lower seroprevalence in *A. flavicollis*. The detection of seroconversions across all seasons studied, even between years, indicates that rodents are likely exposed to year-round infection pressure. Since *Clethrionomys* spp. have 3–4 litters during the reproductive season from April to the end of September and *Apodemus* spp. have 2–3 litters from March to the end of October, naïve animals are always present in the natural focus which can become infected, and thus serve as a transmission source of TBEV for juvenile tick stages during the viremic phase of up to 28 days post-infection [23,49]. Due to the short lifespan of rodents (maximum 11 months in our study) and the low annual recapture rates (3.8–4.3%), it can be inferred that a new naïve population builds up each year in spring and is infected by ticks in which the virus has overwintered. Similar data were described in a seroprevalence study of recaptured

rodents from Hungary, where the maximum lifespan was 1–1.5 years and the recapture rates from last year ranged from 1.3–7.3% [30].

The movement profiles of the recaptured animals were particularly interesting in the study site of Haselmuehl because the three sub-plots were close to each other (distance of 30–40 m). It turned out that among the 141 recaptures, not a single animal was caught in two different sub-plots. In the literature, home ranges of *Cl. glareolus* are described from 737–1753 m² and for *A. flavicollis* 100–2300 m² [50,51]. Thus, as in Haselmuehl, a footpath or a meadow represent natural barriers for the rodents, which will not be crossed under optimal living conditions. From this, we can infer that the virus cycle between juvenile ticks and rodents occurs in several small microfoci with an average size of about 0.5 to 1 ha forming a natural focus. From these microfoci, infected adult ticks passively migrate with the help of larger wild animals to other locations to form a new microfoculus under adequate conditions, which would be, i.e., formed by the presence of vector and reservoir hosts, suitable climatic conditions for the vitality of *I. ricinus* and the presence of coniferous or mixed forests [11].

4. Materials and Methods

4.1. Study Area

The study was conducted in two well-studied natural foci of TBE at Haselmuehl and Heselbach, where viral sequences were previously obtained from TBEV strains from questing ticks [28]. The first site, “Haselmuehl,” is a rural area in the administrative district of Amberg-Sulzbach, around 60 km east of Nuremberg, in the German federal state of Bavaria (Figure 3). It is located 430 m above sea level at a geographic longitude of 11°52′53.6″ E and a latitude of 49°24′31.0″ N. The sampling site is divided into three sub-plots (Ham1–3) separated through a footpath or a meadow, which have a size of 0.03 to 0.05 ha and are close to each other (Figure 2). The second site, “Heselbach,” is a rural area in the administrative district of Schwandorf, more than 26 km southeast of Haselmuehl, in the German federal state of Bavaria (Figure 3). It is located 440 m above sea level at geographic longitude 12°12′02.4″ E and latitude 49°17′51.2″ N. This sampling site is divided into two sub-plots (Heb1 and 2) with a distance of 500 m in between, which have a size of 0.02 and 0.15 ha (Figure 2). The sampling sites in Haselmuehl and Heselbach are characterized by mixed forests with primary pines (*Pinus sylvestris*), fern species, hazelnut, broom, and blackberry bushes. Both study sites belong to the two most affected TBE districts in Germany concerning the current five-year incidence (2017–2021), with an incidence of 55.34/100,000 inhabitants for the district of Amberg-Sulzbach, and an incidence of 40.96/100,000 inhabitants for the district of Schwandorf [6].



Figure 3. Overview of Bavaria (dark grey) in Germany (white) with the location of the study area marked by a square (a); trapping locations within the study area (b). The image was created by using Google Earth Pro, Map: Google Earth ©2022 Google, Image Landsat/Copernicus ©2022 GeoBasis-DE/BKG.

4.2. Small Mammal Trapping and Sampling

Small mammals were trapped for 8 months per year from March to October in the years 2019–2022, except for April and May 2020, when rodent trapping was not possible due to travel restrictions during the COVID-19 pandemic. The trapping grid consisted of 50 live animal traps (sized $7.62 \times 8.89 \times 22.86$ cm, H. B. Sherman Inc., Tallahassee, FL, USA) per study area set in lines at 5–15 m intervals covering the sub-plots, if possible, over a rodent hole or near a tree trunk (Figure 2). Each trap is assigned a number, which is recorded on the trap log of the respective trap location. Live traps were set for two consecutive nights and baited with peanut flips and apple pieces. Wood wool was placed in the traps to provide nesting material and to prevent hypothermia (overall 30 trapping sessions, 60 trapping nights). The traps were checked in 12-h intervals in the morning and evening. The captured rodents were placed individually in a bucket and anesthetized with isoflurane at a 5% concentration and an oxygen flow of 1 L/min until the motorial movement of the rodent was no longer observed. Subsequently, inhalation anesthesia was maintained with isoflurane at a 2.5–3.5% concentration and an oxygen flow of 1 L/min to reduce stress during handling and sampling. At first capture, each rodent was individually marked with a transponder (Glass transponder EM4102, 2.12×12 mm, LUX-IDent s.r.o., Lanškroun, Czech Republic). Trapping location and date of capture, species, sex, reproductive status (testicles visible for males; vagina open, teats formed for females), body mass, and length were recorded, ectoparasites collected located on the rodent, and 100–200 μ L of blood was taken through the retro-orbital sinus from rodents weighing over 14 g. By documenting the exact trapping location within the sub-plots of the study sites, we could create movement profiles of the re-captured animals to make a statement about the distances covered. The rodents were divided into two age groups (juvenile and adult) instead of three based on weight and time between the re-captures (age class 1 and 2, respectively 1 comprise juvenile *Cl. glareolus*, respectively *A. flavicollis*; age class 3 respectively age class 2 and 3 comprise adult *Cl. glareolus* respectively *A. flavicollis*) [52]. Accordingly, individuals weighing less than 19.5 g (less than 2.5 months old) for *Cl. glareolus* and 20 g for *A. flavicollis* (less than 3.5 months old) were considered juveniles. When the time between the re-captures was longer than 2.5 months for *Cl. glareolus*, respectively 3.5 months for *A. flavicollis*, the rodent was classified as an adult. The number of captures and the number of samples were not equal since some animals were not sampled due to weakened physical conditions or the body weight was below 14 g. After sampling, the rodents were placed back into the bucket. Anesthetic treatment was stopped, and rodents were observed. Animals that were visibly fully awake were released at the exact location of capture, and traps were re-baited. For rodents that were re-captured within a trapping session, only the location of capture was documented and afterward directly released. Once a rodent was captured in three different months, it was euthanized by exsanguination through the retro-orbital sinus, followed by neck fracture under anesthesia, as described above. Euthanized rodents and rodents that died in the traps were immediately stored on dry ice (-80 °C). Together with the blood samples, stored at $+4$ °C, they were transported to the laboratory for further processing. In the laboratory, the blood samples were centrifugated at 7000 rpm for 8 min, and serum samples were obtained from the supernatant. A thoracic lavage with 500 μ L phosphate-buffered saline buffer (PBS) was taken from rodents that died in the trap. Serum and thoracic lavage samples were frozen at -80 °C until testing for TBEV antibodies.

4.3. Ethical Statement

The animal experiment with small mammals fulfilled the EU Directive 2010/63/EU and was approved by the District Government of Lower Franconia (RUF-55.2.2-2532-2-780-15). All efforts were made to minimize animal suffering. *Apodemus flavicollis* is a protected species in Germany according to Section 7, paragraph 2, Section 13, letter c) of the Federal Nature Conservation Act (BNatSchG) in connection with attachment 1 of the Federal Species Protection Regulations (BArtSchV). The exemption for this study was approved by the District Government of Upper Palatinate (ROP-SG55.1-8646.4-1-96-19).

Only trained staff was handling the animals under EU directive 2010/63 Function A and following the recommendations of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) and the Society of Laboratory Animals (GV-SOLAS). The rodent trapping took place with permission from the landowners.

4.4. Serological Analysis

4.4.1. Indirect Immunofluorescence Assay (IIFA)

Serum and thoracic lavage samples were transported on dry ice to the Bundeswehr Institute of Microbiology (Munich, Germany) and were screened for the presence of TBEV antibodies using an IIFA (FSME-Viren (TBEV), Euroimmun AG, Luebeck, Germany). The testing was performed according to the manufacturer's instructions with appropriate adaptation for examining rodent samples instead of human samples, as it has already been performed with dog samples [34]. Therefore, the enclosed fluorescein-labeled anti-human conjugate was replaced with an anti-mouse conjugate (DAKO, Glostrup, Denmark) and used in a pre-defined 1:20 dilution. Serum samples were diluted 1:10, according to the dilution scheme to determine antibodies of the IgG class. Thoracic lavage samples were used without dilution, assuming a dilution of about 1:10 before the examination for TBEV-specific antibodies. The results were read independently by two trained staff members using a fluorescence microscope (Leica DM 5000B, Wetzlar, Germany) and classified as either "positive" (fine to coarse granular structures fluoresce in the cytoplasm, no fluorescence in the control field) or "negative" (no fluorescence in the cytoplasm visible, no fluorescence in the control field/uncharacteristic fluorescence in positive and control field), as recommended by the manufacturers.

4.4.2. Serum Neutralization Test (SNT)

To avoid false positive samples, the IIFA-positive thoracic lavage samples of 2019–2022 were confirmed with the SNT, which was not used for serum samples due to the insufficient amount of serum obtained by retro-orbital puncture. The SNTs were performed according to standard procedures [53] using the validated protocol of the accredited diagnostic laboratory at the Bundeswehr Institute of Microbiology (Munich, Germany) [54]. In summary, TBEV (strain Neudoerfl) was cultured in A549 cells, and virus stocks (40–60 tissue culture infective dose (TCID)₅₀ /50 µL) were prepared and stored at −80 °C until further use. SNTs were performed in a micro-format in 96-well cell culture plates (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany). After inactivation of thoracic lavage samples at 56 °C for 30 min, they were run in duplicate and diluted in Minimal Essential Medium (MEM, plus Non-Essential Amino Acids Solution plus Antibiotic-Antimycotic Solution; all Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Germany). Assuming a predilution of about 1:10, the dilutions ranged from 1:20–1:2560. One cell control and one virus re-titration were used as controls on each 96-well plate. A total of 40–60 TCID₅₀ of virus stock was added to each well, and the respective thoracic lavage-virus solutions were incubated at 37 °C (5% CO₂) for one hour. A549 cells (1 × 10⁴ cells/50 µL) were then added per well and incubated at 37 °C (5% CO₂) for 5–7 days. The supernatant was then discarded, and the 96-well plates were fixed in 13% formalin/PBS, stained with crystal violet (0.1%), and the titers were determined visually. The antibody titer corresponding to the highest thoracic lavage dilution that showed complete inhibition of cytopathic effect (CPE) in both wells was reported. Samples were classified as either "SNT negative" (titer < 1:20) or "SNT positive" (titer ≥ 1:20), with the highest readable titer being ≥ 1:2560.

4.5. Statistical Analysis

4.5.1. Definition

The trapping sessions from March to October 2019 to 2022 were divided into three seasons: spring grouped the captures of March to May (beginning of small mammal reproduction); summer corresponded to the captures of June to August (peak of small

mammal reproduction); and autumn grouped the captures of September and October (reduction of small mammal abundance).

The calculation of the density is based on the minimal number alive (MNA), i.e., the number of individual rodents captured in a season plus the number of rodents captured in at least one previous and one following season to estimate the population size. The number of captures was divided by the size of the sampling sites in the unit ha and extrapolated to 0.5 ha for better illustration and comparison.

4.5.2. Statistical Analyses of TBEV Seroprevalence in Small Mammals

Confidence intervals (95% CI) for the prevalence were determined by the Clopper and Pearson method with GraphPad Software (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). To analyze TBEV prevalence in small mammals in relation to season, year, habitat, and small mammal species, we conducted a generalized linear mixed model (GLMM) with binomial error distribution using R-software (version 4.1.2. for Windows, Boston, MA, USA) and the lme4 package [55]. The infection status was used as a binary dependent variable (TBEV-seropositive = 1; TBEV-seronegative = 0). The GLMM was generated to estimate how (1) seasonality (independent binary variable: summer vs. spring); (2) small mammal species (independent categorical variable); (3) host age (independent binary variable: adult vs. juvenile), and (4) sex (independent binary variable: male vs. female), (5) year of capture (independent categorical variable), and (6) habitat (independent binary variable: Haselmuehl vs. Heselbach) affect individual infection status (dependent binary variable). For small mammals, the interaction term for the GLMM consisted of three variables with at least two levels each. Therefore, we computed marginal means using the emmeans package within R and a post hoc test for comparing the effects of all independent variables separately [56]. The significance threshold was set at $p \leq 0.05$.

5. Conclusions

This study presents for the first time the seroprevalence rates of TBEV antibodies in wild rodents in the two natural foci of Haselmuehl and Heselbach in Germany over four years. TBEV antibodies were detected at an average prevalence rate of 16.9% in rodent sera and thoracic lavage, irrespective of seasonal or annual variation. This was regardless of the detection of seroconversions across seasons and between years. This confirms the presence of TBEV at suspected sites in reservoir hosts and the possibility of TBEV infection in rodents throughout the year. Antibodies were detected in a maximum period of 189 days for *Cl. glareolus* and 69 days for *A. flavicollis*, indicating a very long, maybe life-long period of circulating TBEV antibodies. Male adult bank voles were more often infected with TBEV in our study. Yellow-necked mice probably play a subordinate role as hosts in the TBEV cycle. Thus, the probability of infection of rodents depends rather on individual factors such as species, age, and sex than on abiotic and biotic external factors such as study site of a natural focus, year, and season. More studies of this type on other TBEV natural foci and reservoir hosts, as well as experimental studies with rodents and ticks, are necessary to better understand the time of infection and seroconversion for *Cl. glareolus* and *A. flavicollis* and the period of seropositivity as a contribution to a better understanding of the complex life cycle of TBEV.

Author Contributions: Conceptualization, G.D. and M.P.; methodology, P.J.B., A.O., H.M.S., G.D., L.C.-D. and M.P.; sample collection, P.J.B. and H.M.S.; validation, P.J.B. and A.O.; formal analysis, P.J.B. and A.O.; investigation, P.J.B., H.M.S., G.D. and L.C.-D.; data curation, P.J.B. and A.O.; writing—original draft preparation, P.J.B.; writing—review and editing, A.O., H.M.S., G.D., L.C.-D. and M.P.; visualization, P.J.B.; supervision, A.O., G.D. and M.P.; project administration, G.D. and M.P.; funding acquisition, G.D. and M.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the German Federal Ministry of Education and Research within the Research Network of Zoonotic Infectious Diseases as part of the joint research project “Tick-borne encephalitis in Germany” (TBENAGER) to MP (grant number 01KI2010D) and GD (grant number 01KI2010A). We acknowledge support from the German Research Foundation (DFG) and Leipzig University within the program of Open Access Publishing by covering the publication fees.

Institutional Review Board Statement: The animal protocol was approved by the Veterinary and Consumer Protection Division of the Environment, Health, and Consumer Protection Department of the District Government of Lower Franconia (protocol code RUF-55.2.2-2532-2-780-15 from 13 December 2018).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors are very grateful to all persons who helped during rodent trapping, especially Sara Weilage, Elisabeth Fritsch, Nina Król, Leonard Gothe, Mario Reinhardt, and Philipp Koch, and to the District Government of Lower Franconia and the District Government of Upper Palatinate, who authorized trapping in the study sites Haselmuehl, and Heselbach. Other thanks to Jens Jacob from the Julius Kühn-Institute for providing the transponders for marking the rodents.

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

References

1. Lindquist, L.; Vapalahti, O. Tick-borne encephalitis. *Lancet* **2008**, *371*, 1861–1871. [CrossRef]
2. Mansfield, K.L.; Johnson, N.; Phipps, L.P.; Stephenson, J.R.; Fooks, A.R.; Solomon, T. Tick-borne encephalitis virus—A review of an emerging zoonosis. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 1781–1794. [CrossRef]
3. Dobler, G.; Gniel, D.; Petermann, R.; Pfeffer, M. Epidemiology and distribution of tick-borne encephalitis. *Wien. Med. Wochenschr.* **2012**, *162*, 230–238. [CrossRef] [PubMed]
4. Amato-Gauci, A.J.; Zeller, H. Tick-borne encephalitis joins the diseases under surveillance in the European Union. *Eurosurveillance* **2012**, *17*, 20299. [CrossRef]
5. European Centre for Disease Prevention and Control. Tick-borne encephalitis—Annual Epidemiological Report for 2020. Available online: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/tick-borne-encephalitis-annual-epidemiological-report-2020> (accessed on 3 November 2022).
6. Robert Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin*; Robert-Koch-Institut: Berlin/Wernigerode, Germany, 2022; Volume 9, pp. 3–19.
7. Deviatkin, A.A.; Karganova, G.G.; Vakulenko, Y.A.; Lukashev, A.N. TBEV Subtyping in Terms of Genetic Distance. *Viruses* **2020**, *12*, 1240. [CrossRef]
8. Ruzek, D.; Salát, J.; Palus, M.; Gritsun, T.S.; Gould, E.A.; Dyková, I.; Skallová, A.; Jelínek, J.; Kopecký, J.; Grubhoffer, L. CD8+ T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis. *Virology* **2009**, *384*, 1–6. [CrossRef] [PubMed]
9. Valarcher, J.F.; Hägglund, S.; Juremalm, M.; Blomqvist, G.; Chirico, J. Tick-borne encephalitis. *Rev. Sci. Tech.* **2015**, *34*, 453–466. [CrossRef] [PubMed]
10. Bogovic, P.; Strle, F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *WJCC* **2015**, *3*, 430–441. [CrossRef]
11. Borde, J.P.; Glaser, R.; Braun, K.; Riach, N.; Hologa, R.; Kaier, K.; Chitimia-Dobler, L.; Dobler, G. Decoding the Geography of Natural TBEV Microfoci in Germany: A Geostatistical Approach Based on Land-Use Patterns and Climatological Conditions. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 11830. [CrossRef]
12. Labuda, M.; Randolph, S.E. Survival strategy of tick-borne encephalitis virus: Cellular basis and environmental determinants. *Zent. Für Bakteriol.* **1999**, *289*, 513–524. [CrossRef]
13. Randolph, S.E. Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda’s enduring paradigm. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2011**, *2*, 179–182. [CrossRef] [PubMed]
14. Karbowiak, G.; Biernat, B. The role of particular tick developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens affecting humans in Central Europe. 2. Tick-borne encephalitis virus. *Ann. Parasitol.* **2016**, *62*, 3–9. [CrossRef] [PubMed]
15. Tonteri, E.; Jääskeläinen, A.E.; 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*, 72–75. [CrossRef] [PubMed]
16. Bakhvalova, V.N.; Dobrotvorsky, A.K.; Panov, V.V.; Matveeva, V.A.; Tkachev, S.E.; Morozova, O.V. Natural tick-borne encephalitis virus infection among wild small mammals in the southeastern part of western Siberia, Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2006**, *6*, 32–41. [CrossRef]
17. Kerlik, J.; Avdičová, M.; Musilová, M.; Běrešová, J.; Mezencev, R. Breast Milk as Route of Tick-Borne Encephalitis Virus Transmission from Mother to Infant. *Emerg. Infect. Dis.* **2022**, *28*, 1060–1061. [CrossRef]

18. Achazi, K.; Růžek, D.; Donoso-Mantke, O.; Schlegel, M.; Ali, H.S.; Wenk, M.; Schmidt-Chanasit, J.; Ohlmeyer, L.; Rühle, F.; Vor, T.; et al. Rodents as sentinels for the prevalence of tick-borne encephalitis virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2011**, *11*, 641–647. [CrossRef]
19. Lipowski, D.; Popiel, M.; Perlejewski, K.; Nakamura, S.; Bukowska-Osko, I.; Rzakiewicz, E.; Dzieciatkowski, T.; Milecka, A.; Wenski, W.; Ciszek, M.; et al. A Cluster of Fatal Tick-borne Encephalitis Virus Infection in Organ Transplant Setting. *J. Infect. Dis.* **2017**, *215*, 896–901. [CrossRef]
20. Weidmann, M.; Schmidt, P.; Hufert, F.T.; Krivanec, K.; Meyer, H. Tick-borne encephalitis virus in *Clethrionomys glareolus* in the Czech Republic. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2006**, *6*, 379–381. [CrossRef]
21. Knap, N.; Korva, M.; Dolinšek, V.; Sekirnik, M.; Trilar, T.; Avšič-Zupanc, T. Patterns of tick-borne encephalitis virus infection in rodents in Slovenia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2012**, *12*, 236–242. [CrossRef]
22. Zöldi, V.; Papp, T.; Reiczigel, J.; Egyed, L. Bank voles show high seropositivity rates in a natural TBEV focus in Hungary. *Infect. Dis.* **2015**, *47*, 178–181. [CrossRef]
23. Michelitsch, A.; Fast, C.; Sick, F.; Tews, B.A.; Stiasny, K.; Bestehorn-Willmann, M.; Dobler, G.; Beer, M.; Wernike, K. Long-term presence of tick-borne encephalitis virus in experimentally infected bank voles (*Myodes glareolus*). *Ticks Tick-Borne Dis.* **2021**, *12*, 101693. [CrossRef] [PubMed]
24. Michelitsch, A.; Tews, B.A.; Klaus, C.; Bestehorn-Willmann, M.; Dobler, G.; Beer, M.; Wernike, K. In Vivo Characterization of Tick-Borne Encephalitis Virus in Bank Voles (*Myodes glareolus*). *Viruses* **2019**, *11*, 1069. [CrossRef] [PubMed]
25. Grzybek, M.; Alsarraf, M.; Tołkacz, K.; Behnke-Borowczyk, J.; Biernat, B.; Stańczak, J.; Strachecka, A.; Guz, L.; Szczepaniak, K.; Paleolog, J.; et al. Seroprevalence of TBEV in bank voles from Poland—a long-term approach. *Emerg. Microbes Infect.* **2018**, *7*, 145. [CrossRef] [PubMed]
26. Bournez, L.; Umhang, G.; Moinet, M.; Richomme, C.; Demerson, J.-M.; Caillot, C.; Devillers, E.; Boucher, J.-M.; Hansmann, Y.; Boué, F.; et al. Tick-Borne Encephalitis Virus: Seasonal and Annual Variation of Epidemiological Parameters Related to Nymph-to-Larva Transmission and Exposure of Small Mammals. *Pathogens* **2020**, *9*, 518. [CrossRef]
27. Borde, J.P.; Kaier, K.; Hehn, P.; Matzarakis, A.; Frey, S.; Bestehorn, M.; Dobler, G.; Chitimia-Dobler, L. The complex interplay of climate, TBEV vector dynamics and TBEV infection rates in ticks—Monitoring a natural TBEV focus in Germany, 2009–2018. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0244668. [CrossRef]
28. Weidmann, M.; Frey, S.; Freire, C.C.M.; Essbauer, S.; Růžek, D.; Klempa, B.; Zubrikova, D.; Vögerl, M.; Pfeffer, M.; Hufert, F.T.; et al. Molecular phylogeography of tick-borne encephalitis virus in central Europe. *J. Gen. Virol.* **2013**, *94*, 2129–2139. [CrossRef]
29. Robert Koch-Institut. SurvStat@RKI 2.0. Available online: <https://survstat.rki.de/Content/Query/Create.aspx> (accessed on 4 November 2022).
30. Zöldi, V.; Papp, T.; Rigó, K.; Farkas, J.; Egyed, L. A 4-year study of a natural tick-borne encephalitis virus focus in Hungary, 2010–2013. *EcoHealth* **2015**, *12*, 174–182. [CrossRef]
31. Viro, P.; Niethammer, J. *Clethrionomys glareolus* (Schreber, 1780)—Rötelmaus. In *Handbuch der Säugetiere Europas*; Niethammer, J., Krapp, F., Eds.; Akademische Verlagsgesellschaft: Wiesbaden, Germany, 1982.
32. Torre, I.; Arrizabalaga, A. Habitat preferences of the bank vole *Myodes glareolus* in a Mediterranean mountain range. *Acta Theriol.* **2008**, *53*, 241–250. [CrossRef]
33. Litzba, N.; Zelená, H.; Kreil, T.R.; Niklasson, B.; Kühlmann-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]
34. Girtl, P.; Haut, M.; Riederer, S.; Pfeffer, M.; Dobler, G. Comparison of Three Serological Methods for the Epidemiological Investigation of TBE in Dogs. *Microorganisms* **2021**, *9*, 399. [CrossRef]
35. Gilbert, L.; Jones, L.D.; Hudson, P.J.; Gould, E.A.; Reid, H.W. Role of small mammals in the persistence of Louping-ill virus: Field survey and tick co-feeding studies. *Med. Vet. Entomol.* **2000**, *14*, 277–282. [CrossRef] [PubMed]
36. Burri, C.; Korva, M.; Bastic, V.; Knap, N.; Avsic-Zupanc, T.; Gern, L. Serological evidence of tick-borne encephalitis virus infection in rodents captured at four sites in Switzerland. *J. Med. Entomol.* **2012**, *49*, 436–439. [CrossRef]
37. Zeman, P.; Januška, J. Epizootiologic background of dissimilar distribution of human cases of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in a joint endemic area. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **1999**, *22*, 247–260. [CrossRef] [PubMed]
38. Kozuch, O.; Gresiková, M.; Nosek, J.; Lichard, M.; Sekeyová, M. The role of small rodents and hedgehogs in a natural focus of tick-borne encephalitis. *Bull. World Health Organ.* **1967**, *36*, 61–66. [PubMed]
39. Kozuch, O.; Labuda, M.; Lysý, J.; Weismann, P.; Krippel, E. Longitudinal study of natural foci of Central European encephalitis virus in West Slovakia. *Acta Virol.* **1990**, *34*, 537–544. [PubMed]
40. Kocianová, E.; Kozuch, O.; Bakoss, P.; Reháček, J.; Kováčová, E. The prevalence of small terrestrial mammals infected with tick-borne encephalitis virus and leptospirae in the foothills of the southern Bavarian forest, Germany. *Appl. Parasitol.* **1993**, *34*, 283–290.
41. Dizij, A.; Kurtenbach, K. *Clethrionomys glareolus*, but not *Apodemus flavicollis*, acquires resistance to *Ixodes ricinus* L., the main European vector of *Borrelia burgdorferi*. *Parasite Immunol.* **1995**, *17*, 177–183. [CrossRef]
42. Heigl, Z.; von Zeipel, G. Experimental Infection with Tick-Borne Encephalitis Virus in *Clethrionomys glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus* and *Mus musculus*. I. Virological Studies. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **1966**, *66*, 489–509. [CrossRef]

43. Von Zeipel, G.; Heigl, Z. Experimental infection with tick-borne virus in *Clethrionomys glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus* and *Mus musculus*. 2. Serological studies. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **1966**, *68*, 211–229. [CrossRef]
44. Labuda, M.; Nuttall, P.A.; Kozuch, O.; Elecková, E.; Williams, T.; Zuffová, E.; Sabó, A. Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: A mechanism for arbovirus survival in nature. *Experientia* **1993**, *49*, 802–805. [CrossRef]
45. Radda, A.; LOEW, J.; Pretzmann, G. Investigations in a Natural Focus of Early Summer Meningoencephalitis in Lower Austria. 2. Attempt to isolate Virus from Arthropods and Small Mammals. *Zent. Fur Bakteriol. Parasitenkd. Infekt. Und Hyg.* **1963**, *190*, 281–298.
46. Hughes, V.L.; Randolph, S.E. Testosterone increases the transmission potential of tick-borne parasites. *Parasitology* **2001**, *123*, 365–371. [CrossRef]
47. Grzybek, M.; Bajer, A.; Bednarska, M.; Al-Sarraf, M.; Behnke-Borowczyk, J.; Harris, P.D.; Price, S.J.; Brown, G.S.; Osborne, S.-J.; Siński, E.; et al. Long-term spatiotemporal stability and dynamic changes in helminth infracommunities of bank voles (*Myodes glareolus*) in NE Poland. *Parasitology* **2015**, *142*, 1722–1743. [CrossRef]
48. Labuda, M.; Kozuch, O.; Zuffová, E.; Elecková, E.; Hails, R.S.; Nuttall, P.A. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology* **1997**, *235*, 138–143. [CrossRef]
49. Stenseth, N.C.; Viljugrein, H.; Jędrzejewski, W.; Mysterud, A.; Pucek, Z. Population dynamics of *Clethrionomys glareolus* and *Apodemus flavicollis*: Seasonal components of density dependence and density independence. *Acta Theriol.* **2002**, *47*, 39–67. [CrossRef]
50. Vukićević-Radić, O.; Mati, R.; Kataranovski, D.; Stamenković, S. Spatial organization and home range of *Apodemus flavicollis* and *A. agrarius* on Mt. Avala, Serbia. *Acta Zool. Acad. Sci. Hung.* **2006**, *52*, 81–96.
51. Bujalska, G.; Grüm, L. Social organization of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*, Schreber 1780) and its demographic consequences: A model. *Oecologia* **1989**, *80*, 70–81. [CrossRef] [PubMed]
52. Bajer, A.; Bednarska, M.; Pawełczyk, A.; Behnke, J.M.; Gilbert, F.S.; Sinski, E. Prevalence and abundance of *Cryptosporidium parvum* and *giardia* spp. in wild rural rodents from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitology* **2002**, *125*, 21–34. [CrossRef] [PubMed]
53. Cullinane, A.A.; Garvey, M. A review of diagnostic tests recommended by the World Organisation for Animal Health Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. *Rev. Sci. Tech.* **2021**, *40*, 75–89. [CrossRef] [PubMed]
54. Coroian, M.; Mihalca, A.D.; Dobler, G.; Euringer, K.; Girl, P.; Borşan, S.-D.; Kalmár, Z.; Tincuța Briciu, V.; Flonta, M.; Topan, A.; et al. Seroprevalence Rates against West Nile, Usutu, and Tick-Borne Encephalitis Viruses in Blood-Donors from North-Western Romania. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 8182. [CrossRef] [PubMed]
55. Bates, D.; Mächler, M.; Bolker, B.; Walker, S. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J. Stat. Soft.* **2015**, *67*, 1–48. [CrossRef]
56. Length, R.; Singmann, H.; Love, J.; Buerkner, P.; Herve, M. Emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means. *R Package Version* **2018**, *1*, 3.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

4 Diskussion und Schlussfolgerung

Diese vierjährige Studie von 2019 bis 2022 erweitert unser Wissen über die saisonale und interannuelle Dynamik der FSME-Zirkulation bei kleinen Säugetieren in zwei aktiven natürlichen FSME-Mikrofoki und liefert zusätzliche Informationen über demographische Wirtsfaktoren, die die FSME-Infektion auf individueller Ebene beeinflussen. Unsere Ergebnisse bestätigen eine aktive Zirkulation von FSME-Viren in mindestens zwei verschiedenen Nagetierarten in zwei FSME-Naturherden. Diese Studie ist die erste, in der Kleinsäuger auf die Dynamik von FSME-Virus-Antikörper über vier Jahre in Deutschland untersucht wurden. Die beiden FSME-Naturherde, Haselmühl und Heselbach, wurden als FSME-Mikrofoki identifiziert, nachdem Anwohner in der Nähe der Foki klinische FSME-Symptome entwickelt hatten. Seit 2009 konnte das FSME-Virus in Zecken nachgewiesen werden (KERLIK et al. 2022, WEIDMANN et al. 2013). Beide Orte liegen in einem der am stärksten von FSME betroffenen Gebiete in Deutschland, mit den höchsten Inzidenzraten im aktuellen Fünfjahreszeitraum (2018 – 2022), mit insgesamt 113 gemeldeten humanen Fällen in beiden Landkreisen zusammen (ROBERT KOCH-INSTITUT 2023b).

Die Populationsdichten von *A. flavicollis* und *C. glareolus* (71 – 445 Individuen/Jahr/0,5 ha) an diesen Standorten wurden in der aktuellen Studie untersucht und waren vergleichbar mit den Populationsdichten aus einer FSME-Seroprävalenzstudie in Ungarn (78 – 165 Individuen/Jahr/0,5 ha) (ZÖLDI et al. 2015b) und wesentlich höher als die Dichten aus Frankreich (4 – 57 Individuen/Jahr/0,5 ha) (BOURNEZ et al. 2020). Das reichhaltige Nahrungsangebot an Früchten, Pilzen und Samen in einem Gebiet ist für die Aufrechterhaltung der Nagetierpopulation von entscheidender Bedeutung (VIRO und NIETHAMMER 1982). Diese Umweltbedingungen schienen in unseren Untersuchungsgebieten ausreichend zu sein, um die Nagetierpopulation während des Untersuchungszeitraums stabil zu halten. Außerdem wurde die Populationsstruktur durch die Freilassung der Nagetiere nach den ersten beiden Fängen so wenig wie möglich durch unsere Arbeitstätigkeit gestört. Damit das FSME-Virus in der Natur erfolgreich zirkulieren kann, benötigt es ein Gebiet mit hohen Nagetier- und Zeckenpopulationsdichten und Wäldern mit dichtem Unterholz, die in beiden Untersuchungsgebieten vorhanden sind (BORDE et al. 2021, TORRE und ARRIZABALAGA 2008).

Für den Nachweis einer FSME-Infektion bei Nagetieren sind serologische Testsysteme die Methoden der Wahl, da für den Virusnachweis mittels PCR oder Virusisolierung in der Regel

Organmaterial benötigt wird, was den Tod des Tieres zur Folge hat. Der SNT gilt als der spezifischste serologische Test, allerdings muss mit lebenden Viren unter BSL-3-Laborbedingungen gearbeitet werden (LITZBA et al. 2014). Während Methoden wie der IFT, den wir in unserer Studie hauptsächlich verwendet haben, im Vergleich zum SNT eine Sensitivität von fast 80 % und eine Spezifität von fast 99 % erreichen, wenn sie mit Hundeseren getestet werden (GIRL et al. 2021), fehlen solche vergleichenden Studien für Seren von wilden Nagetieren. Mögliche Kreuzreaktionen mit anderen Flaviviren, wie z.B. dem West-Nil-Virus oder dem Louping-III-Virus, sind vernachlässigbar, da Nagetiere erstens keine natürlichen Reservoirs in den enzootischen Zyklen dieser Viren sind und in den Untersuchungsgebieten nicht vorkommen und zweitens keine Wirte für diese Virusübertragenden Stechmückenarten sind (GILBERT et al. 2000). Aus diesen Gründen haben wir die Gelegenheit genutzt, um zu testen, ob der IFT eine geeignete Alternative für den Nachweis von Antikörpern gegen das FSME-Virus bei Kleinsäufern darstellt. Daher wurden alle Thoraxspülproben aus den Jahren 2019 – 2022, die mit dem IFT positiv getestet worden waren, mittels SNT verifiziert. Es zeigte sich eine Sensitivität von 94,3 % im Vergleich zu den SNT-Ergebnissen. Die Möglichkeit besteht, dass mit dem IFT spezifische Antikörper gegen das FSME-Virus nachgewiesen werden, die keine neutralisierende Aktivität aufweisen und daher vom SNT nicht erfasst werden, was die etwas niedrigere Nachweisrate erklären könnte (GIRL et al. 2021).

In unserer Studie wurden bei 16,9 % der untersuchten Proben FSME-Virus-Antikörper nachgewiesen. Die Seroprävalenz in der aktuellen Studie ist höher als in Studien in Nord- und Mitteleuropa, die ebenfalls Nagetierproben serologisch mittels IFT untersucht haben. Während landesweite Studien aus Slowenien (5,9 %) (KNAP et al. 2012), Deutschland (10,2 %) (ACHAZI et al. 2011) und der Schweiz (3,6 %) (BURRI et al. 2012) niedrige bis moderate Seroprävalenzen ergaben, lag die Seroprävalenz in zwei FSME-Naturherden in Finnland bei 4,0 % (TONTERI et al. 2011). Andere serologische Studien mit unterschiedlichen Testmethoden von Naturherden in West- und Mitteleuropa veröffentlichten Seroprävalenzen von 5,1 % in Ungarn (ZÖLDI et al. 2015b), 14,8 % in Polen (GRZYBEK et al. 2018), 1,5 % in der Tschechischen Republik (ZEMAN und JANUŠKA 1999), 7,0 % bzw. 14,6 % in der Slowakei (KOZUCH et al. 1967, KOZUCH et al. 1990), 4,2 % in Frankreich (BOURNEZ et al. 2020) und 14,0 % in Bayern, Deutschland (KOCIANOVÁ et al. 1993). Eine Studie aus Russland zeigte eine Seroprävalenz von 61,4 % bei Kleinsäufern in einem

Untersuchungsgebiet mit anderen FSME-Virussubtypen (TBEV-FE und TBEV-Sib). Die hohe Prävalenz kann durch die stärker pathogenen FSME-Virussubtypen, TBEV-FE und TBEV-Sib, erklärt werden (BAKHVALOVA et al. 2006). Hinsichtlich der Seroprävalenzraten sind unsere Ergebnisse für *C. glareolus* (19,4 %) im höchsten Prävalenzbereich innerhalb Europas (2,2 % bis 20,5 %) einzuordnen (TONTERI et al. 2011, ZÖLDI et al. 2015a, GRZYBEK et al. 2018, BOURNEZ et al. 2020, ZEMAN und JANUŠKA 1999, KOZUCH et al. 1967, KOZUCH et al. 1990, KOCIANOVÁ et al. 1993), mit z.B. 14,3 % in Slowenien (KNAP et al. 2012), 5,3 % in der Schweiz (BURRI et al. 2012) und 12,9 % in Deutschland (ACHAZI et al. 2011). Bei *A. flavicollis* (10,5 %) in unserer Studie schwankt die Prävalenz im mittleren Bereich (1,3 % bis 18,1 %) (ZÖLDI et al. 2015a, BOURNEZ et al. 2020, BURRI et al. 2012, ZEMAN und JANUŠKA 1999, KOZUCH et al. 1967, KOCIANOVÁ et al. 1993), mit beispielsweise 4,0 % in Slowenien (KNAP et al. 2012), 18,1% in der Slowakei (KOZUCH et al. 1990) und 8,1 % in Deutschland (ACHAZI et al. 2011).

In Haselmühl scheinen *A. flavicollis* einen geringen Beitrag zur FSME-Zirkulation zu leisten (1,6 %). In Heselbach wurden seropositive *A. flavicollis* nur in den Jahren 2019 (22,6 %) und 2020 (20,0 %) gefunden, aber nicht im Jahr 2021 und nur ein Individuum im Sommer 2022 (7,7 %), was auf eine untergeordnete Rolle für die Verbreitung des Virus innerhalb der untersuchten Naturherde dieser Nagetierart hindeutet. Eine ähnliche Seroprävalenz für *A. flavicollis* wurde in Ungarn (3,7 %) (ZÖLDI et al. 2015a) und in der Schweiz (1,3 %) beschrieben (BURRI et al. 2012). Die Tatsache, dass die FSME-Virus Prävalenz bei *C. glareolus* höher ist, wurde auch schon früher beschrieben (TONTERI et al. 2011, ACHAZI et al. 2011, KNAP et al. 2012, GRZYBEK et al. 2018). Eine Studie aus Frankreich zeigte eine signifikant höhere Zeckenlast bei *A. flavicollis* im Vergleich zu *C. glareolus* (BOURNEZ et al. 2020), die nach wiederholtem Befall durch die Beteiligung von T-Helferzellen an der Immunantwort eine Resistenz gegen Zeckenbefall entwickeln können. Außerdem scheint *A. flavicollis* aufgrund der größeren Körperoberfläche anfälliger für Zeckenbefall zu sein (DIZIJ und KURTENBACH 1995). Dies sollte zu einer höheren Prävalenz bei *A. flavicollis* führen. Der Nachweis einer stärkeren Virämie, höherer Antikörpertiter und einer längeren Halbwertszeit von Antikörpern gegen das FSME-Virus bei *C. glareolus* im Vergleich zu *Apodemus*-Arten widerspricht jedoch diesen Annahmen, was vermutlich auf die Besonderheit der Immunantwort auf eine FSME-Virusinfektion zurückzuführen ist (KNAP et al. 2012, HEIGL und ZEIPPEL 1966, ZEIPPEL und HEIGL 1966, LABUDA et al. 1993). Die oben dargestellten

Ergebnisse deuten also darauf hin, dass *C. glareolus* im Vergleich zu *A. flavicollis* für den Erhalt des FSME-Virus in einem Naturherd bedeutsamer ist.

Ein weiteres Ergebnis unserer Studie war, dass bei der Art *C. glareolus* deutlich mehr Männchen (40,4 %) seropositiv waren als Weibchen (15,6 %) und bei der Art *A. flavicollis* signifikant mehr Weibchen (18,5 %) als Männchen (7,1 %). Ein Grund dafür könnte sein, dass männliche *C. glareolus* aufgrund häufigerer Ausflüge zur Paarung und Nahrungssuche größere Reviere haben und dadurch möglicherweise häufiger mit einer größeren Anzahl von Zecken in der Vegetation in Berührung kommen (ZÖLDI et al. 2015a, RADDI et al. 1963). Aufgrund des hohen Testosteronspiegels weisen sexuell aktive *C. glareolus* auch eine verringerte Immunität auf, so dass mehr Zecken aufgesammelt werden können und die Übertragungswahrscheinlichkeit des FSME-Virus steigt (HUGHES und RANDOLPH 2001). Das Alter des Wirts spielt in unserer Studie ebenfalls eine wichtige Rolle, da es die FSME-Virus Seroprävalenz bei Nagetieren erheblich beeinflusst. Diese Beobachtung wurde auch durch andere Studien in Ungarn und Polen bestätigt (ZÖLDI et al. 2015a, GRZYBEK et al. 2018). Während des Untersuchungszeitraums war die Seroprävalenz des Virus bei erwachsenen *C. glareolus* und *A. flavicollis* (25,4 % bzw. 12,0 %) höher als bei Jungtieren (9,8 % bzw. 3,2 %). Auch in Ungarn und Polen waren mehr erwachsene *C. glareolus* (25,9 % bzw. 20,8 %) seropositiv als Jungtiere (8,3 % bzw. 8,7 %) (ZÖLDI et al. 2015a, GRZYBEK et al. 2018). Die Wahrscheinlichkeit und die Möglichkeiten eines Zeckenbefalls nehmen mit dem Alter des Wirts zu (GRZYBEK et al. 2015). Darüber hinaus nimmt die Seroprävalenz mit dem Alter zu, da Antikörper mutmaßlich über einen langen Zeitraum (189 Tage) nachgewiesen werden können und daher davon ausgegangen werden kann, dass einmal infizierte *C. glareolus* ihr Leben lang seropositiv bleiben. Dennoch müssen diese Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden, da wir nur das Gewicht als Parameter für die Alterseinstufung verwendet haben und drei Individuen hatten, die beim Wiederfang seronegativ, aber zuvor seropositiv waren. Eine weitere Einschränkung der Studie besteht darin, dass wir durch das Studiendesign nicht klären können, ob die Seropositivität durch eine einmalige FSME-Virusinfektion oder durch wiederholte Stiche infizierter Zecken aufrechterhalten wird. Unter Laborbedingungen wurden 100 Tage Seropositivität bei *C. glareolus* nachgewiesen, jedoch wurde das Experiment nur 100 Tage durchgeführt (ACHAZI et al. 2011).

Von 2019 bis 2022 konnten wir keine signifikanten Unterschiede in der FSME-Virus Seroprävalenz bei Nagetieren feststellen, obwohl die Populationsdichte der Kleinsäuger im

Laufe der Jahre abgenommen hat. Eine höhere Seroprävalenz wäre in Jahren mit weniger Nagetieren zu erwarten. Eine erhöhte Zeckenbelastung pro Individuum, wie sie in Frankreich beschrieben wurde, trat also nicht auf, wo insgesamt 541 Kleinsäuger im Jahr 2012, 36 im Jahr 2013 und 87 im Jahr 2014 beprobt wurden und die Seroprävalenz von 3,5 % auf 1,1 % gesunken war. Im Gegensatz dazu stieg die Zeckenbefallsrate bei Nagetieren im Laufe der Jahre von 38,2 % auf 83,3 % (BOURNEZ et al. 2020, BURRI et al. 2012). Es ist bekannt, dass Antikörper gegen das FSME-Virus im Blut von Nagetieren bereits 5 Tage nach der Infektion nachweisbar sind (ACHAZI et al. 2011, MICHELITSCH et al. 2021). In mehreren Studien wurden FSME-Virus-Antikörper bis zu 100 – 168 Tage nach der Infektion nachgewiesen (ACHAZI et al. 2011, LABUDA et al. 1997). In unserer Studie waren bis auf drei Nagetiere alle Nagetiere bei Wiederfängen durchgehend seropositiv, wobei der längste Zeitraum mit bis zu 189 Tagen bei *C. glareolus* und 69 Tagen bei *A. flavicollis* auf eine sehr lange Zirkulationsdauer der FSME-Virus-Antikörper hindeutet. Die Tatsache, dass es sich bei zwei der drei Nagetiere, die bei Wiederfängen seropositiv zu seronegativ konvertierten, um *A. flavicollis* handelte und der Nachweiszeitraum der Seropositivität kürzer war als bei *C. glareolus*, könnte dies ebenfalls ein Grund für die niedrigere Seroprävalenz bei *A. flavicollis* sein. Der Nachweis von Serokonversionen in allen untersuchten Jahreszeiten, sogar zwischen verschiedenen Jahren, deutet darauf hin, dass die Nagetiere wahrscheinlich ganzjährig einem Infektionsdruck ausgesetzt sind. Da *Clethrionomys species pluralis* (spp.) während der Fortpflanzungszeit von April bis Ende September 3 – 4 Würfe und *Apodemus* spp. von März bis Ende Oktober 2 – 3 Würfe haben, sind im Naturherd immer naive Tiere vorhanden. Diese können sich infizieren und dienen somit neben der transvariellen Übertragung infizierter adulter Zecken auch als Übertragungsquelle des FSME-Virus für juvenile Zeckenstadien während der virämischen Phase von bis zu 28 Tagen nach der Infektion (MICHELITSCH et al. 2021, STENSETH et al. 2002). Aufgrund der kurzen Lebensdauer der Nagetiere (maximal 11 Monate in unserer Studie) und der geringen jährlichen Wiederfangraten (3,8 – 4,3 %) lässt sich ableiten, dass sich jedes Jahr im Frühjahr eine neue Nager-Population von Zecken infiziert, in denen das Virus überwintert hat, und somit im Frühjahr seropositive Tiere vorhanden sind. Ähnliche Daten wurden in einer Seroprävalenzstudie an Nagetieren, die mehrfach gefangen wurden, aus Ungarn beschrieben, wo die maximale Lebensdauer 1 – 1,5 Jahre betrug und die Wiederfangraten vom letzten Jahr zwischen 1,3 – 7,3 % lagen (ZÖLDI et al. 2015b).

Die Bewegungsprofile der wiedergefangenen Tiere waren im Untersuchungsgebiet von Haselmühl besonders interessant, da die drei Untersuchungsflächen nahe beieinander lagen (Abstand 30 – 40 m). Es stellte sich heraus, dass unter den 141 Wiederfängen kein einziges Tier in zwei verschiedenen Untersuchungsflächen gefangen wurde. In der Literatur werden Bewegungsradien von *C. glareolus* mit 737 – 1753 m² und von *A. flavicollis* mit 100 – 2300 m² angegeben (VUKIĆEVIĆ-RADIĆ et al. 2006, BUJALSKA und GRÜM 1989). Wie in Haselmühl, stellen ein Fußweg oder eine Wiese natürliche Barrieren für die Nager dar, die unter optimalen Lebensbedingungen nicht überschritten werden. Daraus lässt sich ableiten, dass der Lebenszyklus des FSME-Virus zwischen juvenilen Zecken und Nagetieren in mehreren kleinen Mikrofoki mit einer durchschnittlichen Größe von 0,5 bis 1 ha stattfindet, die einen Naturherd bilden. Von diesen Mikrofoki aus wandern infizierte adulte Zecken passiv mit Hilfe größerer Wildtiere zu anderen Orten, um unter geeigneten Bedingungen einen neuen Mikrofokus zu bilden, der z.B. durch das Vorhandensein von Vektor- und Reservoirwirten, durch geeignete klimatische Bedingungen für die Vitalität von *I. ricinus* und das Vorhandensein von Nadel- oder Mischwäldern gebildet wird (BORDE et al. 2022).

In dieser Studie wurden erstmals die Seroprävalenzraten von FSME-Virus-Antikörpern bei wildlebenden Nagetieren in den beiden Naturherden Haselmühl und Heselbach in Deutschland über vier Jahre hinweg untersucht. Unabhängig von saisonalen oder jährlichen Schwankungen wurden FSME-Virus-Antikörper mit einer durchschnittlichen Prävalenzrate von 16,9 % in Nagerseren und Thoraxspülproben nachgewiesen. Dies gilt unabhängig von der Feststellung von Serokonversionen über die Jahreszeiten und zwischen verschiedenen Jahren. Dies bestätigt das Vorhandensein des FSME-Virus an den Untersuchungsorten in Reservoirwirten und die Möglichkeit einer FSME-Virusinfektion bei Nagetieren während des gesamten Jahres. Antikörper wurden in einem Zeitraum von maximal 189 Tagen bei *C. glareolus* und 69 Tagen bei *A. flavicollis* nachgewiesen, was auf eine sehr lange, möglicherweise lebenslange Periode zirkulierender FSME-Virus-Antikörper hinweist. Die Infektionswahrscheinlichkeit von Nagetieren hängt eher von individuellen Faktoren, wie Art, Alter und Geschlecht, ab als von abiotischen und biotischen äußeren Faktoren, wie Untersuchungsort eines Naturherdes, Jahr und Jahreszeit. Weitere Studien dieser Art an anderen FSME-Virus Naturherden und Reservoirwirten, sowie experimentelle Studien mit Nagetieren und Zecken sind notwendig, um den Zeitpunkt der Infektion und der Serokonversion bei *C. glareolus* und *A. flavicollis*, sowie den Zeitraum der Seropositivität

besser zu verstehen, um damit einen Beitrag zum besseren Verständnis des komplexen Lebenszyklus des FSME-Virus zu leisten.

5 Zusammenfassung

Verfasser Philipp Johannes Brandenburg

Titel Seroprävalenz der Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus-Infektion bei wildlebenden Nagern aus zwei Naturherden in Bayern, Deutschland

Institut Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen

Eingereicht im März 2023

50 Seiten, 8 Abbildungen, 1 Tabelle, 1 Publikation, 123 Quellen

Schlüsselwörter: *Clethrionomys glareolus*, *Apodemus flavicollis*, Epidemiologie, Frühsommer-Meningoenzephalitis, Seroprävalenz

Einleitung

Die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) ist die medizinisch wichtigste durch Zecken übertragene virale Erkrankung des Menschen in Europa und Asien, welche jährlich 10.000 – 15.000 humane Fälle auf beiden Kontinenten verursacht. Das Verbreitungsgebiet der FSME erstreckt sich von Japan bis Frankreich. Das FSME-Virus zirkuliert in Mikrofoki, zwischen Zecken als natürlichen Vektoren und Säugetierwirten, insbesondere Nagetieren wie der Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*) und der Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*). Der Mensch infiziert sich mit dem FSME-Virus durch einen Zeckenstich, durch den Verzehr von infizierter Rohmilch oder entsprechenden Milchprodukten und in seltenen Fällen durch Organtransplantationen oder Muttermilch.

Ziel der Untersuchung

Die große Bedeutung von Nagetieren als Teil des FSME-Übertragungszyklus wurde in den vergangenen Jahrzehnten bestätigt. Jedoch gibt es immer noch Wissenslücken über die Dynamik der FSME-Virusinfektion in Nagetierpopulationen in natürlichen FSME-Mikrofoki. Ziel der Studie war es deshalb, in bekannten FSME-Naturherden saisonale und zwischenjährliche Dynamiken des Virus bei wilden Nagetieren festzustellen und einen möglichen Einfluss von demographischen Wirtsfaktoren für eine FSME-Virusinfektion auf individueller Basis herauszufinden.

Tiere, Material und Methoden

Die Studie wurde in zwei gut untersuchten FSME-Naturherden in Haselmühl und Heselbach in der Oberpfalz, Bayern, durchgeführt. Nagetiere der Arten *C. glareolus* und *A. flavicollis* wurden von März bis Oktober 2019 bis 2022 einmal pro Monat für zwei aufeinanderfolgende

Nächte in 50 Lebendfallen pro Standort gefangen, mit Isofluran anästhesiert und mit einem Transponder markiert. Anschließend wurde eine Blutprobe entnommen und das Serum auf Antikörper gegen das FSME-Virus mit einem indirekten Immunfluoreszenz-Test (IIFT) untersucht. Danach wurden die Tiere am Fangort wieder ausgesetzt. Sobald ein Nagetier in drei verschiedenen Monaten gefangen wurde, erfolgte die Euthanasie und die Entnahme einer Thoraxspülprobe, die ebenfalls serologisch mittels IIFT untersucht wurde. Die Konfidenzintervalle (95 % KI) für die Prävalenz von Antikörpern gegen das FSME-Virus in den Nagetieren, wurden mit der Methode nach Clopper und Pearson in GraphPad-Software errechnet. Der Einfluss individueller Charakteristika der Nagetiere sowie Jahr des Fangs, Jahreszeit und Standort wurden in einem linear gemischten Model mit des *lme4* Pakets in R-Software berechnet.

Ergebnisse

In der Studie konnten insgesamt 706 Fänge von 500 Individuen dokumentiert werden, von denen 651 Proben von 478 Individuen (338 *C. glareolus*; 140 *A. flavicollis*) serologisch untersucht wurden. Es konnte eine Gesamtprävalenz von 16,9 % (95 % KI: 14,2 – 20,0) ermittelt werden. Rötelmäuse (19,4 %) waren häufiger betroffen als Gelbhalsmäuse (10,5 %). Der Anteil der Seropositivität unterschied sich zwischen den Jahren nicht signifikant und lag zwischen 11,8 % im Jahr 2021 und 19,2 % im Jahr 2020. Die Jahreszeiten Frühling (23,6 %), Sommer (20,2 %) und Herbst (10,8 %) hatten keinen Einfluss auf die Infektionswahrscheinlichkeit der Nagetiere. Auch zwischen den Standorten Haselmühl (15,7 %) und Heselbach (17,8 %) gab es keine Unterschiede in der Prävalenz. Die Seropositivität der Geschlechter unterschied sich signifikant zwischen weiblichen (18,5 %) und männlichen *A. flavicollis* (7,1 %). Bei *C. glareolus* wurde bei den Männchen (40,4 %) ein signifikant höherer Anteil an Seropositivität beobachtet als bei den Weibchen (15,6 %). Adulte *A. flavicollis* (12,0 %) wiesen eine signifikant höhere Seroprävalenz auf als Juvenile (3,2 %), ebenso wie bei adulten *C. glareolus* (25,4 %) und Juvenilen (9,8 %).

Schlussfolgerungen

Unabhängig von saisonalen oder jährlichen Schwankungen wurden FSME-Virus-Antikörper mit einer Prävalenzrate von 16,9 % nachgewiesen. Männliche erwachsene Rötelmäuse waren in unserer Studie häufiger mit dem FSME-Virus infiziert. Gelbhalsmäuse spielen als Wirte im FSME-Viruszyklus wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle.

6 Summary

Author Philipp Johannes Brandenburg

Title Seroprevalence of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Wild Rodents from Two Natural Foci in Bavaria, Germany

Institute Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health

Submitted in March 2023

50 pages, 8 figure, 1 table, 1 publication, 123 references

Key words: *Clethrionomys glareolus*, *Apodemus flavicollis*, epidemiology, tick-borne encephalitis, seroprevalence

Introduction

Tick-borne encephalitis (TBE) is the medically most important viral tick-borne disease of humans in Europe and Asia, causing 10.000 – 15.000 human cases annually on both continents. The distribution area of TBE now extends between Japan and France. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) circulates in microfoci, between ticks as natural vectors and mammalian hosts, especially rodents such as the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) and the yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*). Humans become infected with TBEV through a tick bite, consumption of infected raw milk or corresponding dairy products, and in rare cases through organ transplants or breast milk.

Aims of the study

The great importance of rodents, as part of the TBE transmission cycle has been confirmed in the past decades. However, there are still gaps in our knowledge about the dynamics of TBEV infection in rodent populations in natural TBE microfoci. Therefore, the aim of this study was to determine seasonal and interannual dynamics of the virus in wild rodents in known TBE natural foci and to find out a possible influence of host demographic factors for TBEV infection on an individual basis.

Animals, material and methods

The study was conducted in two well-studied TBE natural foci in Haselmuehl and Heselbach in Upper Palatinate, Bavaria. Rodents of the species *C. glareolus* and *A. flavicollis* were trapped once per month for two consecutive nights from March to October 2019 to 2022 using 50 live traps per site, anesthetized with isoflurane, and marked with a transponder. A blood sample was then collected, and serum was analyzed for TBEV antibodies using an

indirect immunofluorescence assay (IIFA). The animals were then released back at the capture site. Once a rodent was captured in three different months, it was euthanized and a thoracic lavage sample was collected, which was also examined serologically by IIFA. Confidence intervals (95 % CI) for the prevalence of TBEV antibodies in the rodents, were calculated using the Clopper and Pearson method with GraphPad-software. The influence of individual characteristics of the rodents as well as year of capture, season, and location was calculated in a generalized linear mixed model using the *lme4* package within the R-software.

Results

The study documented a total of 706 catches of 500 individuals, of which 651 samples from 478 individuals (338 *C. glareolus*; 140 *A. flavicollis*) were serologically analyzed. An overall prevalence of 16.9 % (95 % CI: 14.2 – 20.0) was determined. Bank voles (19.4 %) were more frequently affected than yellow-necked mice (10.5 %). The proportion of seropositivity did not differ significantly between years, ranging from 11.8 % in 2021 to 19.2 % in 2020. The seasons of spring (23.6 %), summer (20.2 %), and autumn (10.8 %) did not affect the likelihood of infection in rodents. There were also no differences in the prevalence between the locations Haselmuehl (15.7 %) and Heselbach (17.8 %). Sex seropositivity differed significantly between female (18.5 %) and male *A. flavicollis* (7.1 %). In *C. glareolus*, a significantly higher proportion of seropositivity was observed in males (40.4 %) than in females (15.6 %). Adult *A. flavicollis* (12.0 %) had a significantly higher seroprevalence than juveniles (3.2 %), as did adult *C. glareolus* (25.4 %) and juveniles (9.8 %).

Conclusions

Regardless of seasonal or annual variation, TBEV antibodies were detected at a prevalence rate of 16.9 %. Male adult bank voles were more frequently infected with TBEV in our study. Yellow-necked mice probably play a subordinate role as hosts in the TBEV cycle.

7 Referenzen

7.1 Literaturverzeichnis

Achazi K, Ruzek D, Donoso-Mantke O, Schlegel M, Ali HS, Wenk M et al. Rodents as sentinels for the prevalence of tick-borne encephalitis virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11(6):641–7. doi: 10.1089/vbz.2010.0236.

Aulagnier S, Haffner P, Mitchell-Jones AJ, Moutou F, Zima J, Chevallier J et al. Die Säugetiere Europas, Nordafrikas und Vorderasiens: Der Bestimmungsführer 2009:194.

Bakhvalova VN, Chicherina GS, Potapova OF, Panov VV, Glupov VV, Potapov MA et al. Tick-Borne Encephalitis Virus Diversity in Ixodid Ticks and Small Mammals in South-Western Siberia, Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2016; 16:541–9. doi: 10.1089/vbz.2015.1834.

Bakhvalova VN, Dobrotvorsky AK, Panov VV, Matveeva VA, Tkachev SE, Morozova OV. Natural tick-borne encephalitis virus infection among wild small mammals in the southeastern part of western Siberia, Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2006; 6(1):32–41. doi: 10.1089/vbz.2006.6.32.

Beck C, Jimenez-Clavero MA, Leblond A, Durand B, Nowotny N, Leparc-Goffart I et al. Flaviviruses in Europe: complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of West Nile disease. *Int J Environ Res Pub Health* 2013; 10(11):6049–83. doi: 10.3390/ijerph10116049.

Bogovic P, Lotric-Furlan S, Strle F. What tick-borne encephalitis may look like: clinical signs and symptoms. *Travel Med Infect Dis* 2010; 8(4):246–50. doi: 10.1016/j.tmaid.2010.05.011.

Bogovic P, Strle F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *WJCC* 2015; 3(5):430–41. doi: 10.12998/wjcc.v3.i5.430.

Borde JP, Glaser R, Braun K, Riach N, Hologa R, Kaier K et al. Decoding the Geography of Natural TBEV Microfoci in Germany: A Geostatistical Approach Based on Land-Use Patterns and Climatological Conditions. *Int J Environ Res Pub Health* 2022; 19(18):11830. doi: 10.3390/ijerph191811830.

Borde JP, Kaier K, Hehn P, Matzarakis A, Frey S, Bestehorn M et al. The complex interplay of climate, TBEV vector dynamics and TBEV infection rates in ticks-Monitoring a natural TBEV focus in Germany, 2009-2018. *PLoS One* 2021; 16(1):e0244668. doi: 10.1371/journal.pone.0244668.

Bournez L, Umhang G, Moinet M, Richomme C, Demerson J-M, Caillot C et al. Tick-Borne Encephalitis Virus: Seasonal and Annual Variation of Epidemiological Parameters Related to Nymph-to-Larva Transmission and Exposure of Small Mammals. *Pathogens* 2020; 9(7):518. doi: 10.3390/pathogens9070518.

Bröker M, Kollaritsch H. After a tick bite in a tick-borne encephalitis virus endemic area: Current positions about post-exposure treatment. *Vaccine* 2008; 26(7):863–8. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.11.046.

Bujalska G, Grüm L. Social organization of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*, Schreber 1780) and its demographic consequences: a model. *Oecologia* 1989; 80(1):70–81. doi: 10.1007/BF00789934.

Burri C, Korva M, Bastic V, Knap N, Avsic-Zupanc T, Gern L. Serological evidence of tick-borne encephalitis virus infection in rodents captured at four sites in Switzerland. *J Med Entomol* 2012; 49(2):436–9. doi: 10.1603/ME11084.

Charrel RN, Attoui H, Butenko AM, Clegg JC, Deubel V, Frolova TV et al. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(12):1040–55. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.01022.x.

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(1):90. doi: 10.1186/s13071-019-3346-6.

Colangelo P, Aloise G, Franchini P, Annesi F, Amori G. Mitochondrial DNA reveals hidden diversity and an ancestral lineage of the bank vole in the Italian peninsula. *J Zool* 2012; 287(1):41–52. doi: 10.1111/j.1469-7998.2011.00884.x.

- Deffontaine V, Libois R, Kotlík P, Sommer R, Nieberding C, Paradis E et al. Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Mol Ecol* 2005; 14(6):1727–39. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02506.x.
- Demicheli V, Debalini MG, Rivetti A. Vaccines for preventing tick-borne encephalitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; 2009(1):CD000977. doi: 10.1002/14651858.CD000977.pub2.
- Deplazes P, Eckert J, Mathis A, Samson-Himmelstjerna G von, Zahner H. *Parasitology in veterinary medicine*. Wageningen 2016.
- Deviatkin AA, Karganova GG, Vakulenko YA, Lukashev AN. TBEV Subtyping in Terms of Genetic Distance. *Viruses* 2020; 12(11):1240. doi: 10.3390/v12111240.
- Dizij A, Kurtenbach K. *Clethrionomys glareolus*, but not *Apodemus flavicollis*, acquires resistance to *Ixodes ricinus* L., the main European vector of *Borrelia burgdorferi*. *Parasite Immunol* 1995; 17(4):177–83. doi: 10.1111/j.1365-3024.1995.tb00887.x.
- Dobler G. Zoonotic tick-borne flaviviruses. *Vet Microbiol* 2010; 140(3-4):221–8. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.08.024.
- Dobler G, Erber W, Bröker M, Schmitt H-J. *The TBE Book: 3rd Edition: Global Health Press Pte Ltd; 2020.*
- Dobler G, Gniel D, Petermann R, Pfeffer M. Epidemiology and distribution of tick-borne encephalitis. *Wien Med Wochenschr* 2012; 162(11-12):230–8. doi: 10.1007/s10354-012-0100-5.
- Dörrbecker B, Dobler G, Spiegel M, Hufert FT. Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host. *Travel Med Infect Dis* 2010; 8(4):213–22. doi: 10.1016/j.tmaid.2010.05.010.
- Dumpis U, Crook D, Oksi J. Tick-borne encephalitis. *Clin Infect Dis* 1999; 28(4):882–90. doi: 10.1086/515195.

- Ecker M, Allison SL, Meixner T, Heinz FX. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J Gen Virol* 1999; 80(1):179–85. doi: 10.1099/0022-1317-80-1-179.
- Gelpi E, Preusser M, Laggner U, Garzuly F, Holzmann H, Heinz FX et al. Inflammatory response in human tick-borne encephalitis: analysis of postmortem brain tissue. *J Neurovirol* 2006; 12(4):322–7. doi: 10.1080/13550280600848746.
- Gilbert L, Jones LD, Hudson PJ, Gould EA, Reid HW. Role of small mammals in the persistence of Louping-ill virus: field survey and tick co-feeding studies. *Med Vet Entomol* 2000; 14(3):277–82. doi: 10.1046/j.1365-2915.2000.00236.x.
- Girj P, Haut M, Riederer S, Pfeffer M, Dobler G. Comparison of Three Serological Methods for the Epidemiological Investigation of TBE in Dogs. *Microorganisms* 2021; 9(2):399. doi: 10.3390/microorganisms9020399.
- Gritsun T, Lashkevich V, Gould E. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res* 2003; 57(1-2):129–46. doi: 10.1016/S0166-3542(02)00206-1.
- Grulich I. The European mole (*Talpa europaea* L. —Mamm. Insectivora) as an important host of the tick (*Ixodes ricinus* L.) in Czechoslovakia. *J Pest Sci* 1961; 62-62
- Grulich I, Nosek J, Szabó L. The autecology of small rodents and insectivores of the Tribec mountain range. *Bull World Health Organ* 1967; 36(Suppl 1):25–30.
- Grzybek M, Alsarraf M, Tołkacz K, Behnke-Borowczyk J, Biernat B, Stańczak J et al. Seroprevalence of TBEV in bank voles from Poland—a long-term approach. *Emerg Microbes Infect* 2018; 7(1):145. doi: 10.1038/s41426-018-0149-3.
- Grzybek M, Bajer A, Bednarska M, Al-Sarraf M, Behnke-Borowczyk J, Harris PD et al. Long-term spatiotemporal stability and dynamic changes in helminth infracommunities of bank voles (*Myodes glareolus*) in NE Poland. *Parasitol* 2015; 142(14):1722–43. doi: 10.1017/S0031182015001225.

Günther G, Haglund M. Tick-borne encephalopathies-Epidemiology, Diagnosis, Treatment and Prevention. *CNS Drugs* 2005; 19(12):1009–32. doi: 10.2165/00023210-200519120-00004.

Gustafson R, Svenungsson B, Forsgren M, Gardulf A, Granström M. Two-year survey of the incidence of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in a high-risk population in Sweden. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11(10):894–900. doi: 10.1007/BF01962369.

Haglund M, Günther G. Tick-borne encephalitis–pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine* 2003; 21:11-8. doi: 10.1016/S0264-410X(02)00811-3.

Heigl Z, Zeipel G von. Experimental Infection with Tick-Borne Encephalitis Virus in *Clethrionomys glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus* and *Mus musculus*. I. Virological Studies. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1966; 66(4):489–509.

Heinz FX. Epitope Mapping of Flavivirus Glycoproteins. In: Maramorosch K, Murphy FA, Shatkin AJ, Hrsg. *Advances in Virus Research*: Academic Press; 1986. p. 103–68.

Hubálek Z, Rudolf I. Tick-borne viruses in Europe. *Parasitol Res* 2012; 111(1):9–36. doi: 10.1007/s00436-012-2910-1.

Hubálek Z, Rudolf I, Nowotny N. Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. *Adv Virus Res* 2014; (89):201–75. doi: 10.1016/b978-0-12-800172-1.00005-7.

Hughes VL, Randolph SE. Testosterone increases the transmission potential of tick-borne parasites. *Parasitol* 2001; 123(Pt 4):365–71. doi: 10.1017/S0031182001008599.

Kaiser R. Tick-Borne Encephalitis. *Infect Dis Clin North Am* 2008; 22(3):561–75. doi: 10.1016/j.idc.2008.03.013.

Kaiser R. Frühsommermeningoenzephalitis. *Nervenarzt* 2016; 87(6):667–80. doi: 10.1007/s00115-016-0134-9.

- Karbowiak G, Biernat B. The role of particular tick developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens affecting humans in Central Europe. 2. Tick-borne encephalitis virus. *Ann Parasitol* 2016; 62(1):3–9. doi: 10.17420/ap6201.25.
- Kerlik J, Avdičová M, Musilová M, Bérešová J, Mezencev R. Breast Milk as Route of Tick-Borne Encephalitis Virus Transmission from Mother to Infant. *Emerg Infect Dis* 2022; 28(5):1060–1. doi: 10.3201/eid2805.212457.
- Klaus C, Hörügel U, Hoffmann B, Beer M. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection in horses: clinical and laboratory findings and epidemiological investigations. *Vet Microbiol* 2013; 163(3-4):368–72. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.12.041.
- 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(1):78. doi: 10.1186/1746-6148-10-78.
- 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(3):236–42. doi: 10.1089/vbz.2011.0728.
- Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Malcom MA, Roizman B et al. *Flaviviridae*. *Fields virology* 2007; 5:1101–52.
- Kocianová E, Kozuch O, Bakoss P, Reháček J, Kováčová E. The prevalence of small terrestrial mammals infected with tick-borne encephalitis virus and leptospirae in the foothills of the southern Bavarian forest, Germany. *Appl Parasitol* 1993; 34(4):283–90.
- Kollaritsch H, Paulke-Korinek M, Holzmann H, Hombach J, Bjorvatn B, Barrett A. Vaccines and vaccination against tick-borne encephalitis. *Expert Rev Vaccines* 2012; 11(9):1103–19. doi: 10.1586/erv.12.86.
- Kotlík P, Deffontaine V, Mascheretti S, Zima J, Michaux JR, Searle JB. A northern glacial refugium for bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(40):14860–4. doi: 10.1073/pnas.0603237103.

- Kotlík P, Marková S, Horníková M, Escalante MA, Searle JB. The Bank Vole (*Clethrionomys glareolus*) as a Model System for Adaptive Phylogeography in the European Theater. *Front Ecol Evol* 2022; 10:352. doi: 10.3389/fevo.2022.866605.
- Kozuch O, Gresíková M, Nosek J, Lichard M, Sekeyová M. The role of small rodents and hedgehogs in a natural focus of tick-borne encephalitis. *Bull World Health Organ* 1967; 36(Suppl 1):61–6.
- Kozuch O, Labuda M, Lysý J, Weismann P, Krippel E. Longitudinal study of natural foci of Central European encephalitis virus in West Slovakia. *Acta Virol* 1990; 34(6):537–44.
- Kozuch O, Nosek J, Ernek E, Lichard M, Albrecht P. Persistence of Tick-Borne Encephalitis Virus in Hibernating Hedgehogs and Dormice. *Acta Virol* 1963; 7(5):430–3.
- Kraft R. Mäuse und Spitzmäuse in Bayern: Verbreitung, Lebensraum, Bestandssituation 2008:63–4.
- Kunz C. Vaccination against TBE in Austria: the success story continues. *Int J Med Microbiol* 2002; 291:56–7. doi: 10.1016/s1438-4221(02)80011-x.
- Kunze U, Asokliene L, Bektimirov T, Busse A, Chmelik V, Heinz FX et al. Tick-borne encephalitis in childhood--consensus 2004. *Wien Med Wochenschr* 2004; 154(9-10):242–5. doi: 10.1007/s10354-004-0061-4.
- Labuda M, Austyn JM, Zuffova E, Kozuch O, Fuchsberger N, Lysy J et al. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* 1996; 219(2):357–66. doi: 10.1006/viro.1996.0261.
- Labuda M, Kozuch O, Zuffová E, Elecková E, Hails RS, Nuttall PA. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology* 1997; 235(1):138–43. doi: 10.1006/viro.1997.8622.
- Labuda M, Nuttall PA, Kozuch O, Elecková E, Williams T, Zuffová E et al. Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature. *Experientia* 1993; 49(9):802–5. doi: 10.1007/BF01923553.

- Labuda M, Randolph SE. Survival strategy of tick-borne encephalitis virus: Cellular basis and environmental determinants. *Zentralbl Bakteriol* 1999; 289(5-7):513–24. doi: 10.1016/S0934-8840(99)80005-X.
- Leonova GN, Maistrovskaia OS. Viremia in patients with tick-borne encephalitis and in persons with attached Ixodes ticks. *Vopr Virusol* 1996; 41(5):224–8.
- Leschnik MW, Kirtz GC, Thalhammer JG. Tick-borne encephalitis (TBE) in dogs. *Int J Med Microbiol* 2002; 291 Suppl 33:66–9. doi: 10.1016/S1438-4221(02)80014-5.
- Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet* 2008; 371(9627):1861–71. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60800-4.
- Lipowski D, Popiel M, Perlejewski K, Nakamura S, Bukowska-Osko I, Rzakiewicz E et al. A Cluster of Fatal Tick-borne Encephalitis Virus Infection in Organ Transplant Setting. *J Infect Dis* 2017; 215(6):896–901. doi: 10.1093/infdis/jix040.
- Litzba N, Zelená H, Kreil TR, Niklasson B, Kühlmann-Rabens I, Remoli ME et al. Evaluation of different serological diagnostic methods for tick-borne encephalitis virus: enzyme-linked immunosorbent, immunofluorescence, and neutralization assay. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2014; 14(2):149–59. doi: 10.1089/vbz.2012.1287.
- Mandl CW, Heinz FX, Stöckl E, Kunz C. Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses. *Virology* 1989; 173(1):291–301. doi: 10.1016/0042-6822(89)90246-8.
- Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, Stephenson JR, Fooks AR, Solomon T. Tick-borne encephalitis virus — a review of an emerging zoonosis. *J Gen Virol* 2009; 90(8):1781–94. doi: 10.1099/vir.0.011437-0.
- Marquardt WC, Kondratieff BC. *Biology of disease vectors*. 2. Aufl. Burlington, MA 2005.
- Michelitsch A, Fast C, Sick F, Tews BA, Stiasny K, Bestehorn-Willmann M et al. Long-term presence of tick-borne encephalitis virus in experimentally infected bank voles (*Myodes glareolus*). *Ticks Tick Borne Dis* 2021; 12(4):101693. doi: 10.1016/j.ttbdis.2021.101693.

Mickienė A, Laiškoniš A, Günther G, Vene S, Lundkvist Å, Lindquist L. Tickborne Encephalitis in an Area of High Endemicity in Lithuania: Disease Severity and Long-Term Prognosis. *Clin Infect Dis* 2002; 35(6):650–8. doi: 10.1086/342059.

Niethammer J, Krapp F. Handbuch der Säugetiere Europas. Band 1, Nagetiere I. Wiesbaden: Akademische Verlagsgesellschaft; 1978.

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(Suppl 1):31–47.

Oliver JH. Biology and Systematics of Ticks (Acari:Ixodida). *Annu Rev Ecol Syst* 1989; 20(1):397–430.

Pavlovsky EN. Natural focality of infectious and parasitic diseases. *Vestn Akad Nauk SSR* 1939; 10:98–108.

Pavlovsky EN. Natural Nidality of Transmissible Diseases: With Special Reference to the Landscape Epidemiology of Zoonthroponoses. University of Illinois Press 1966.

Pfeffer M, Dobler G. Tick-borne encephalitis virus in dogs—is this an issue? *Parasit Vectors* 2011; 4(1):59. doi: 10.1186/1756-3305-4-59.

Pintér R, Madai M, Horváth G, Németh V, Oldal M, Kemenesi G et al. 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(8):621–4. doi: 10.1089/vbz.2013.1479.

Pulkkinen LIA, Butcher SJ, Anastasina M. Tick-Borne Encephalitis Virus: A Structural View. *Viruses* 2018; 10(7):350. doi: 10.3390/v10070350.

Radda A. Die Zeckenzephalitis in Europa. Geographische Verbreitung und Ökologie des Virus. *Z Angew Zool* 1973; 60:409–61.

Radda A, Hofmann H, Kunz C. Viraemia of polecats (*Putorius putorius*) after infection with tick-borne encephalitis (TE) virus by ticks. *Acta Virol* 1969a; 13:159.

- Radda A, Hofmann H, Pretzmann G. Threshold of viraemia in *Apodemus flavicollis* for infection of *Ixodes ricinus* with tick-borne encephalitis virus. *Acta Virol* 1969b; 13(1):74–7.
- Radda A, LOEW J, Pretzmann G. Investigations in a Natural Focus of Early Summer Meningoencephalitis in Lower Austria. 2. Attempt to isolate Virus from Arthropods and Small Mammals. *Zentralbl Bakteriol* 1963; 190(3):281–98.
- Radda A, Pretzmann G, Kovac W. Experimental infection of *Mus musculus* with early summer meningoencephalitis (tick-borne encephalitis) virus. *Zentralbl Bakteriol* 1964; 193:285–92.
- Randolph SE. Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda's enduring paradigm. *Ticks Tick Borne Dis* 2011; 2(4):179–82. doi: 10.1016/j.ttbdis.2011.07.004.
- Robert Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin* 9/2023. Robert-Koch-Institut 2023a; (9):3–20.
- Robert Koch-Institut. *SurvStat@RKI* 2.0; 2023b [Stand: 2023 Mrz 6]. Verfügbar unter: <https://survstat.rki.de>.
- Rubel F, Brugger K, Pfeiffer M, Chitimia-Dobler L, Didyk YM, Leverenz S et al. Geographical distribution of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* in Europe. *Ticks Tick Borne Dis* 2016; 7(1):224–33. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.10.015.
- Rubel F, Brugger K, Walter M, Vogelgesang JR, Didyk YM, Fu S et al. Geographical distribution, climate adaptation and vector competence of the Eurasian hard tick *Haemaphysalis concinna*. *Ticks Tick Borne Dis* 2018; 9(5):1080–9. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.04.002.
- Rubel F, Schiffner-Rohe J. *FSME in Deutschland. Stand der Wissenschaft*. Deutscher-Wissenschafts-Verlag 2019; (1):115–29.

- Rushton JO, Lecollinet S, Hubálek Z, Svobodová P, Lussy H, Nowotny N. Tick-borne encephalitis virus in horses, Austria, 2011. *Emerg Infect Dis* 2013; 19(4):635–7. doi: 10.3201/eid1904.121450.
- Ruzek D, Dobler G, Donoso Mantke O. Tick-borne encephalitis: pathogenesis and clinical implications. *Travel Med Infect Dis* 2010; 8(4):223–32. doi: 10.1016/j.tmaid.2010.06.004.
- Ruzek D, Salát J, Palus M, Gritsun TS, Gould EA, Dyková I et al. CD8+ T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis. *Virology* 2009; 384(1):1–6. doi: 10.1016/j.virol.2008.11.023.
- Schneider H. Über epidemische akute Meningitis serosa. *Wien Klin Wochenschr* 1931; 44:350–2.
- Schwarzenberger T, Klingel H. Telemetrische Untersuchungen zur Raumnutzung und Aktivitätsrhythmik freilebender Gelbhalsmäuse *Apodemus flavicollis* Melchior, 1834. *Mamm Biol* 1995; (60):20–32.
- Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *J Gen Virol* 2017; 98(1):2–3. doi: 10.1099/jgv.0.000672.
- Sinnecker H. Zeckenenzephalitis in Deutschland. *Zentralbl Bakteriologie* 1960; 180:12–8.
- Sonenshine DS, Mather TN. Ecological dynamics of tick-borne zoonoses. Oxford University Press 1994:351–91.
- Stenseth NC, Viljugrein H, Jędrzejewski W, Myrnes A, Pucek Z. Population dynamics of *Clethrionomys glareolus* and *Apodemus flavicollis*: seasonal components of density dependence and density independence. *Acta Theriol* 2002; 47(S1):39–67. doi: 10.1007/BF03192479.
- Studahl M, Lindquist L, Eriksson B-M, Günther G, Bengner M, Franzen-Röhl E et al. Acute viral infections of the central nervous system in immunocompetent adults: diagnosis and management. *Drugs* 2013; 73(2):131–58. doi: 10.1007/s40265-013-0007-5.

- Süss J. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – the epidemiological situation as of 2007. *Eurosurveillance* 2008; 13(26):18916. doi: 10.2807/ese.13.26.18916-en.
- Süss J, Gelpi E, Klaus C, Bagon A, Liebler-Tenorio EM, Budka H et al. Tickborne encephalitis in naturally exposed monkey (*Macaca sylvanus*). *Emerg Infect Dis* 2007; 13(6):905–7. doi: 10.3201/eid1306.061173.
- Thurner C, Witwer C, Hofacker IL, Stadler PF. Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *J Gen Virol* 2004; 85(5):1113–24. doi: 10.1099/vir.0.19462-0.
- Tonteri E, Jääskeläinen AE, Tikkakoski T, Voutilainen L, Niemimaa J, Henttonen H et al. Tick-borne encephalitis virus in wild rodents in winter, Finland, 2008-2009. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(1):72–5. doi: 10.3201/eid1701.100051.
- Torre I, Arrizabalaga A. Habitat preferences of the bank vole *Myodes glareolus* in a Mediterranean mountain range. *Acta Theriol* 2008; 53(3):241–50. doi: 10.1007/BF03193120.
- Valarcher JF, Hägglund S, Juremalm M, Blomqvist G, Chirico J. Tick-borne encephalitis. *Rev Sci Tech* 2015; 34(3):453–66.
- Viro P, Niethammer J. *Clethrionomys glareolus* (Schreber, 1780) — Rötelmaus. In: Niethammer J., Krapp F. (Eds), *Handbuch der Säugetiere Europas*. Wiesbaden, Germany: Akademische Verlagsgesellschaft; 1982.
- Vukićević-Radić O, Mati R, Kataranovski D, Stamenković S. Spatial organization and home range of *Apodemus flavicollis* and *A. agrarius* on Mt. Avala, Serbia. *Acta Zool Acad Sci Hung* 2006; 52(1):81–96.
- Waldvogel K, Bossart W, Huisman T, Boltshauer E, Nadal D. Severe tick-borne encephalitis following passive immunization. *Eur J Pediatr* 1996; 155(9):775–9. doi: 10.1007/BF02002905.

- Weidmann M, Frey S, Freire CCM, Essbauer S, Růžek D, Klempa B et al. Molecular phylogeography of tick-borne encephalitis virus in central Europe. *J Gen Virol* 2013; 94(Pt 9):2129–39. doi: 10.1099/vir.0.054478-0.
- Weidmann M, Schmidt P, Hufert FT, Krivanec K, Meyer H. Tick-borne encephalitis virus in *Clethrionomys glareolus* in the Czech Republic. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2006; 6(4):379–81. doi: 10.1089/vbz.2006.6.379.
- WHO. Vaccines against tick-borne encephalitis: WHO position paper 2011.
- WHO Scientific Group. Arboviruses and human disease. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1967; 18(369):1–84.
- Wilson DE, Reeder DM. *Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference*. 3. Aufl. Baltimore & London: John Hopkins University Press; 2005.
- Zeipel G von, Heigl Z. Experimental infection with tick-borne virus in *Clethrionomys glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus* and *Mus musculus*. 2. Serological studies. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1966; 68(2):211–29.
- Zeman P, Januška J. Epizootiologic background of dissimilar distribution of human cases of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in a joint endemic area. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1999; 22(4):247–60. doi: 10.1016/S0147-9571(99)00015-6.
- Zlobin VI, Pogodina VV, Kahl O. A brief history of the discovery of tick-borne encephalitis virus in the late 1930s (based on reminiscences of members of the expeditions, their colleagues, and relatives). *Ticks Tick Borne Dis* 2017; 8(6):813–20. doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.05.001.
- Zöldi V, Papp T, Reiczigel J, Egyed L. Bank voles show high seropositivity rates in a natural TBEV focus in Hungary. *Infect Dis (Lond)* 2015a; 47(3):178–81. doi: 10.3109/00365548.2014.975743.

Zöldi V, Papp T, Rigó K, Farkas J, Egyed L. A 4-year study of a natural tick-borne encephalitis virus focus in Hungary, 2010-2013. *Ecohealth* 2015b; 12(1):174–82. doi: 10.1007/s10393-014-0969-0.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der FSME-Viruspartikel Struktur; modifiziert nach PULKKINEN et al. (2018).....	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung des kodierenden Abschnittes eines FSME-Virus Genoms mit Darstellung der jeweiligen Genomabschnitte für die Strukturproteine (Capsid (C), precursor of Membrane (prM), Envelope (E)) und die nicht-Strukturproteine (NS1 – NS5); modifiziert nach KNIPE et al. (2007).....	5
Abbildung 3: Gemeldete klinische FSME-Fälle zwischen 2001 und 2023 in Deutschland (ROBERT KOCH-INSTITUT 2023b, Stand 06.03.2023).....	5
Abbildung 4: FSME-Risikogebiete in Deutschland; dunkelblau: FSME-Risikogebiete; hellblau: Risikogebiete die 2023 dazu gekommen sind; weiß: kein Risikogebiet (ROBERT KOCH-INSTITUT 2023a).....	6
Abbildung 5: Übertragungszyklus des FSME-Virus. In der Vektorzecke <i>I. ricinus</i> oder <i>I. persulcatus</i> wird FSME-Virus während des Lebenszyklus entweder durch horizontale Übertragung (Infektion wird an das nächste Lebensstadium weitergegeben; blauer Pfeil) oder durch vertikale Übertragung (Übertragung der Infektion auf die nächste Zeckengeneration; brauner Pfeil) erhalten. Die verschiedenen Lebensstadien der Zecke (Larven, Nymphen, adulte Weibchen) ernähren sich mit unterschiedlicher Präferenz von den verschiedenen Wirtsarten, wobei die weniger reifen Stadien die kleineren Wirte bevorzugen. Der Hauptübertragungsweg des FSME-Virus auf das neue Vektorindividuum erfolgt durch eine Blutmahlzeit auf einem virämischen Wirt (schwarzer Pfeil) oder durch Co-feeding (gestrichelter Pfeil). Die Infektion des Menschen erfolgt meist durch den Befall mit infizierten Nymphen oder adulten Weibchen oder seltener über den alimentären Weg durch den Verzehr von nicht pasteurisierter Milch oder Milchprodukten (weit gestrichelter Pfeil); inspiriert von DOBLER et al. (2012); erstellt mit BioRender.com.	9
Abbildung 6: Die Rötelmaus (<i>C. glareolus</i>) (KOTLÍK et al. 2022).....	14
Abbildung 7: Verteilung der phylogeografischen Linien der Rötelmaus, abgeleitet aus den mitochondrialen DNA-Sequenzen (mtDNA Clade), mit einer schematischen Darstellung der Phylogenie im Bild oben rechts (KOTLÍK et al. 2022).....	15
Abbildung 8: Die Gelbhalsmaus (<i>A. flavicollis</i>) (www.kleinsaeuger-bayern.de).....	16

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nachgewiesene und vermutete (*) Reservoirwirte des FSME-Virus von mitteleuropäischen Wirbeltieren; modifiziert nach RUBEL und SCHIFFNER-ROHE (2019)..... 18

8 Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei Prof. Dr. Martin Pfeffer und den Gutachtern für die Beurteilung dieser Arbeit bedanken.

Besonders danken möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Pfeffer und meiner Betreuerin Dr. Anna Obiegala für die ausgezeichnete Unterstützung bei der Wahl und Anfertigung meiner Dissertation. Ohne euch würde ich immer noch an meiner Publikation verzweifeln und das Ende der Doktorarbeit wäre noch lange nicht in Sicht.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Gerhard Dobler und Dr. Lidia Chitimia-Dobler für die Gastfreundschaft am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München, die Unterstützung bei der Untersuchung der Proben, den wissenschaftlichen Input und das kritische Korrekturlesen bedanken.

Nicht zuletzt muss ich an alle Mitarbeiter und fleißigen Mitdoktoranden am Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, besonders an Sara Weilage und Elisabeth Fritsch, ein Danke für die tatkräftige Unterstützung im Feld aussprechen.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung.

Meiner Familie und der Akita-Bande danke ich für ihre immerwährende Unterstützung im Studium und während der Promotion. Außerdem danke ich meiner Lebenspartnerin für die emotionale und moralische Unterstützung. Danke, dass du mich aus den mentalen Tiefpunkten immer wieder herausgeholt hast.