

Aus dem Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zur saisonalen Aktivität der Buntzecke
Dermacentor reticulatus im Umland von Berlin und
Bestimmung assoziierter Pathogene**



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Mareen Kohn
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2019
Journal-Nr.: 4103

Aus dem Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zur saisonalen Aktivität der Buntzecke
Dermacentor reticulatus im Umland von Berlin und
Bestimmung assoziierter Pathogene**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Mareen Kohn

Tierärztin aus Stralsund

Berlin 2019

Journal-Nr.: 4103

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Karsten Nöckler
Dritter Gutachter: PD Dr. Roswitha Merle

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Dermacentor reticulatus, epidemiology, disease vectors, Ixodes ricinus, Babesia, Borrelia, Anaplasmataceae, Rickettsia, polymerase chain reaction, Berlin

Tag der Promotion: 06.05.2019

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-984-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2019

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2019 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

An Papa und Oma Eva

*„Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten
nicht ausdrücken.“*

Johann Wolfgang von Goethe 1797

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IX
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	2
2.1 Überblick zur Buntzecke <i>Dermacentor reticulatus</i>	2
2.1.1 Systematik und Morphologie.....	2
2.1.2 Geografische Verbreitung und Habitate.....	2
2.1.3 Entwicklungszyklus und Wirtsspektrum	3
2.1.4 Saisonale Aktivität.....	4
2.1.5 Vektorpotenzial	5
2.2 Untersuchte Erreger	5
2.2.1 Im Zusammenhang mit <i>Dermacentor reticulatus</i> beschriebene Piroplasmen	5
2.2.1.1 Systematik und Morphologie	5
2.2.1.2 Verbreitung und Entwicklungsweg (Vektoren, Wirte, Reservoir)	6
2.2.1.3 Prävalenzen von Piroplasmen in wirtssuchenden <i>Dermacentor reticulatus</i>	8
2.2.1.4 Krankheitsbilder bei Mensch und Tier	9
2.2.1.5 Diagnose, Therapie- und Präventionsmaßnahmen	11
2.2.2 Im Zusammenhang mit <i>Dermacentor reticulatus</i> beschriebene <i>Borrelia</i> spp. mit dem Schwerpunkt <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	12
2.2.2.1 Systematik und Morphologie	12
2.2.2.2 <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato-Komplex	12
2.2.2.2.1 Verbreitung und Entwicklungsweg (Vektoren, Wirte, Reservoir).....	12
2.2.2.2.2 Krankheitsbilder, Diagnostik und Therapie.....	13
2.2.2.3 Rückfallfieber-Borrelien	15
2.2.2.4 Prävalenzen von Borrelien in wirtssuchenden <i>Dermacentor reticulatus</i>	15
2.2.3 Im Zusammenhang mit <i>Dermacentor reticulatus</i> beschriebene <i>Anaplasma</i> spp.....	16
2.2.3.1 Systematik und Morphologie	16

Inhaltsverzeichnis

2.2.3.2	Verbreitung und Entwicklungsweg (Vektoren, Wirte, Reservoir)	17
2.2.3.3	Prävalenzen in wirtssuchenden <i>Dermacentor reticulatus</i>	18
2.2.3.4	Krankheitsbilder infolge einer Anaplasmen-Infektion	19
2.2.3.5	Diagnose und Therapie der Krankheitsbilder	21
2.2.4	Die Gattung <i>Ehrlichia</i> mit dem Schwerpunkt <i>Ehrlichia canis</i>	21
2.2.5	<i>Candidatus</i> Neoehrlichia mikurensis	23
2.2.6	Im Zusammenhang mit <i>Dermacentor reticulatus</i> beschriebene <i>Rickettsia</i> spp.	25
2.2.6.1	Systematik und Morphologie	25
2.2.6.2	Verbreitung und Entwicklungsweg (Vektoren, Wirte, Reservoir)	25
2.2.6.3	Rickettsien-Prävalenzen in wirtssuchenden <i>Dermacentor reticulatus</i>	27
2.2.6.4	Krankheitsbilder infolge einer Rickettsien-Infektion, Diagnostik und Therapie....	28
3	MATERIAL UND METHODEN	30
3.1	Material	30
3.1.1	Enzyme, Reagenzien und Mikroorganismen	30
3.1.2	Herstellung von Medien, Puffern und Lösungen	31
3.1.3	Kits	31
3.1.4	Software	32
3.1.5	Verbrauchsmaterialien	32
3.1.6	Technische Geräte	33
3.1.7	Primer und Sonden	34
3.2	Methoden	35
3.2.1	Sammeln von Zecken	35
3.2.1.1	Methodik und Intervalle	35
3.2.1.2	Sammelgebiete	36
3.2.2	Identifizierung der Zeckenspezies und des Geschlechts	39
3.2.3	DNA-Isolation	40
3.2.3.1	Bestimmung der Anzahl der Zecken für die DNA-Isolation	40
3.2.3.2	DNA-Isolationsverfahren	40
3.2.3.3	Bestimmung der Quantität und Qualität der gewonnenen DNA	42
3.2.4	Erregernachweis: Grundlagen und Prinzip	42
3.2.4.1	Prinzip der Polymerasekettenreaktion	42
3.2.4.2	Herstellung von Positivkontrollen	44
3.2.5	Konventionelle PCR-Verfahren zum Nachweis verschiedener Piroplasmen	47
3.2.5.1	PCR zum Nachweis einer Partialesequenz in dem 18S rRNA Gen	48
3.2.5.2	PCR zur Detektion der Internal Transcribed Spacer-1 Region	48

Inhaltsverzeichnis

3.2.6	Nachweis von <i>Borrelia</i> spp.	50
3.2.6.1	Konventionelle PCR zur Detektion der 5S-23S rRNA intergenic spacer region....	51
3.2.6.2	Real-time PCR zur Detektion der 5S-23S rRNA intergenic spacer region	51
3.2.6.3	Konventionelle PCR zum Nachweis einer Sequenz im <i>hbb</i> Gen	53
3.2.7	Nachweis von <i>Anaplasma</i> und <i>Ehrlichia</i> spp. sowie <i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>	53
3.2.7.1	Konventionelle PCR zur Detektion einer Sequenz im 16S rRNA Gen	53
3.2.7.2	High Resolution Melt Analysis zur Detektion der 16S rRNA Gensequenz	55
3.2.8	Konventionelle PCR zum Nachweis von <i>Rickettsia</i> spp. mittels <i>gltA</i> -Gen.....	56
3.2.9	Gelelektrophorese.....	57
3.2.10	Identifizierung der Erregerspezies.....	58
3.2.10.1	Aufreinigung der DNA-Proben mittels Gel-Extraktion und Fällung	58
3.2.10.2	Aufreinigung mittels High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE).....	59
3.2.10.3	Sequenzierung.....	59
3.2.11	Datenberechnungen.....	60
3.2.11.1	Grundlagen: Normierung der Fangdaten.....	60
3.2.11.2	Statistische Berechnungen	60
4	ERGEBNISSE	63
4.1	<i>Dermacentor reticulatus</i>	63
4.1.1	Überblick zu den Fangzahlen	63
4.1.2	Saisonales Aktivitätsmuster adulter <i>Dermacentor reticulatus</i>	65
4.1.3	Entwicklungsstadien und Geschlechterstruktur von <i>Dermacentor reticulatus</i>	66
4.1.4	Einflussfaktoren auf die Aktivität von <i>Dermacentor reticulatus</i>	68
4.1.4.1	Beschreibung der Zeckenaktivität unter Betrachtung abiotischer Parameter	68
4.1.4.1.1	Parameter Fangort	68
4.1.4.1.2	Parameter Jahr.....	68
4.1.4.1.3	Parameter Saison.....	69
4.1.4.1.4	Wetterbedingte Einflüsse auf die Zeckenaktivität.....	70
4.1.4.2	Negativ-Binomial-Regressionsanalyse zur Beurteilung der Bedeutung abiotischer Parameter für die Zeckenaktivität.....	73
4.1.4.2.1	Bedeutung des Faktors Standort.....	77
4.1.4.2.2	Bedeutung des Faktors Jahr	77
4.1.4.2.3	Bedeutung des Faktors Saison	77
4.1.4.2.4	Bedeutung der Temperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit	78
4.1.5	Vergleichende Darstellung zu <i>Ixodes ricinus</i>	79

Inhaltsverzeichnis

4.2	Erregeruntersuchungen.....	82
4.2.1	Etablierung der PCR zum Nachweis verschiedener Piroplasmen	82
4.2.1.1	Auswertung der PCR zum Nachweis der Partialsequenz im 18S rRNA Gen	82
4.2.1.2	Auswertung der PCR zum Nachweis der ITS-1 Region von Babesien	83
4.2.1.2.1	Nachweisspektrum	83
4.2.1.2.2	Ergebnisse zur Optimierung der Reaktionsbedingungen	84
4.2.2	Anzahl und Verteilung untersuchter <i>Dermacentor reticulatus</i>	85
4.2.3	Prävalenzen	85
4.2.3.1	<i>Babesia</i> spp.	85
4.2.3.2	<i>Borrelia</i> spp.....	86
4.2.3.3	Anaplasmataceae	86
4.2.3.4	<i>Rickettsia</i> spp.	87
4.2.3.4.1	Prävalenzen	87
4.2.3.4.2	Logistische Regression zur Beurteilung der Bedeutung verschiedener Parameter für die Rickettsien-Prävalenz.....	90
5	DISKUSSION.....	92
5.1	Untersuchungsmethoden.....	92
5.1.1	Flaggen von Zecken	92
5.1.2	Identifikation von <i>Dermacentor reticulatus</i>	96
5.1.3	Screening ausschließlich weiblicher <i>Dermacentor reticulatus</i>	96
5.1.4	DNA-Isolationsverfahren.....	97
5.1.5	PCR-Untersuchungen.....	98
5.2	Geschlechterverhältnis von <i>Dermacentor reticulatus</i>	100
5.3	Einfluss verschiedener Faktoren auf die Zeckenaktivität	101
5.3.1	Auswertung mittels Negativ-Binomial-Regressionsanalyse	101
5.3.2	Fangort.....	101
5.3.3	Wetterbedingte Einflüsse	103
5.3.4	Jahr.....	107
5.3.5	Saison.....	108
5.4	Prävalenzvergleich und Relevanz der untersuchten Erreger.....	111
5.4.1	<i>Babesia</i> spp.	111
5.4.2	<i>Borrelia</i> spp.....	113
5.4.3	Anaplasmataceae	115
5.4.4	<i>Rickettsia</i> spp.....	117

Inhaltsverzeichnis

5.5	Schlussfolgerungen	121
6	ZUSAMMENFASSUNG	124
7	SUMMARY.....	126
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	128
9	ANHANG	152
9.1	Rohdaten: gesammelte Zecken, Messwerte der Temperatur und relativen Luftfeuchtigkeit für jeden Fangtermin.....	152
9.2	PCR-Bedingungen zum Nachweis einer 18S rRNA Gensequenz von Piroplasmen	156
9.3	Alignment der ITS-1 Sequenzen verschiedener <i>Babesia</i> spp.....	157
10	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	159
11	DANKSAGUNG	161
12	FINANZIERUNGSQUELLEN/INTERESSENSKONFLIKTE	163
13	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	164

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung der Standorte im Berliner Umland zur Sammlung von <i>D. reticulatus</i>	36
Abb. 2: Fotografische Aufnahmen der beprobten Standorte.....	37
Abb. 3: Vektor-Karten der bei der Klonierung von DNA-Material verwendeten Vektoren	45
Abb. 4: Im Jahresverlauf auftretende Aktivitäten von <i>D. reticulatus</i> an den untersuchten Standorten	65
Abb. 5: Anteile männlicher und weiblicher <i>D. reticulatus</i> innerhalb der Saisons Frühjahr und Herbst für alle Standorte.....	67
Abb. 6: Gemeinsame Darstellung der Anzahl gesammelter <i>D. reticulatus</i> pro Stunde sowie der vor Ort gemessenen Temperatur- und relativen Luftfeuchtwerte für alle Standorte	71
Abb. 7: Grafik zum mittels Negativ-Binomial-Regressionsanalyse erstellten Modell 1B mit Darstellung der modellierten und tatsächlichen Fangwerte von <i>D. reticulatus</i>	76
Abb. 8: Prozentuale Verteilung von <i>D. reticulatus</i> und <i>I. ricinus</i> innerhalb der Saisons Frühjahr bis Winter für alle Standorte	82
Abb. 9: Forestplot zu dem in der logistischen Regressionsanalyse erstellten Grundmodell 2A zur Beurteilung möglicher Einflussfaktoren auf die Rickettsien-Prävalenz in <i>D. reticulatus</i>	90
Abb. 10: Forestplot zu dem in der logistischen Regressionsanalyse erstellten Besten Model 2B zur Beurteilung möglicher Einflussfaktoren auf die Rickettsien-Prävalenz in <i>D. reticulatus</i>	91
Abb. 11: Alignment zum Vergleich der ITS-1 Sequenzen verschiedener <i>Babesia</i> spp.	158

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Prävalenzen von <i>Babesia</i> und <i>Theileria</i> spp. in wirtssuchenden <i>D. reticulatus</i>	8
Tab. 2: Prävalenzen von <i>Borrelia</i> spp. in wirtssuchenden <i>D. reticulatus</i>	16
Tab. 3: Prävalenzen von <i>Anaplasma</i> spp., <i>Ehrlichia</i> spp. und <i>Cand. Neoehrlichia</i> mikurensis in wirtssuchenden <i>D. reticulatus</i>	19
Tab. 4: Prävalenzen von <i>Rickettsia</i> spp. in wirtssuchenden <i>D. reticulatus</i>	28
Tab. 5: Reaktionsansatz zur Amplifikation der ITS-1 Region verschiedener <i>Babesia</i> spp. ...	50
Tab. 6: Reaktionsansätze der konventionellen PCR zum Nachweis der Zielsequenz in der 5S-23S rRNA IGS-Region verschiedener Borrelien-Genospezies.....	51
Tab. 7: Reaktionsansatz der real-time PCR zum Nachweis des 5S-23S rRNA IGS-Fragmentes verschiedener Borrelien-Genospezies	52
Tab. 8: Reaktionsansatz zum Nachweis der <i>hbb</i> Gensequenz der Borrelien-Genospezies	53
Tab. 9: Reaktionsansatz zum Nachweis der 16S rRNA Gensequenz verschiedener <i>Anaplasmataceae</i>	55
Tab. 10: Reaktionsansatz zur Schmelzkurvenanalyse von <i>A. phagocytophilum</i> und <i>Cand.</i> <i>Neoehrlichia mikurensis</i> anhand des 16S rRNA Gens	56
Tab. 11: Primer zur Vervielfältigung der Fragmente im <i>gltA</i> Gen von <i>Rickettsia</i> spp.	57
Tab. 12: Reaktionsansätze zum Nachweis der Fragmente im <i>gltA</i> Gen von <i>Rickettsia</i> spp. ...	57
Tab. 13: Überblick zur absoluten Anzahl gesammelter Buntzecken sowie Angabe der Anzahl der Fangtermine und der Gesamtfangdauer pro Jahr	63
Tab. 14: Angabe der durchschnittlichen Fangzahlen adulter <i>D. reticulatus</i> /h sowie der minimalen und maximalen Fangwerte/h getrennt nach Standort, Jahr und Saison....	64
Tab. 15: Überblick zu den absoluten und relativen Fangzahlen weiblicher und männlicher <i>D. reticulatus</i> für alle Standorte	66
Tab. 16: Darstellung der berechneten Durchschnittswerte sowie der Schwankungsbereiche von Temperatur und relativer Luftfeuchtigkeit für alle Kalendermonate	70
Tab. 17: Vergleichende Darstellung des mittels Negativ-Binomial-Regressionsanalyse berechneten Grund- und Schlussmodells.....	75
Tab. 18: Angabe der durchschnittlichen Fangzahl von <i>I. ricinus</i> /h sowie der minimalen und maximalen Fangzahlen/h getrennt nach Standort, Jahr und Saison	80
Tab. 19: Überblick zu den absoluten und relativen Fangzahlen von <i>D. reticulatus</i> und <i>I. ricinus</i>	81
Tab. 20: Überblick zur Anzahl untersuchter <i>D. reticulatus</i> aus allen gesammelten weiblichen Buntzecken	85
Tab. 21: Borrelien-Prävalenzen in <i>D. reticulatus</i>	86

Tabellenverzeichnis

Tab. 22: Prävalenzen von <i>Anaplasma</i> spp., <i>Ehrlichia</i> spp. und <i>Cand. Neoehrlichia</i> mikurensis in <i>D. reticulatus</i>	87
Tab. 23: Prävalenzen von <i>Rickettsia</i> spp. in <i>D. reticulatus</i>	89
Tab. 24: Rohdaten der Felduntersuchungen für den Standort Gatow	152
Tab. 25: Rohdaten der Felduntersuchungen für den Standort Falkenberg.....	153
Tab. 26: Rohdaten der Felduntersuchungen für den Standort Königs Wusterhausen.....	154
Tab. 27: Rohdaten der Felduntersuchungen für den Standort Güterfelde	155
Tab. 28: Reaktionsansatz zur Amplifikation eines Fragmentes der 18S rRNA Region verschiedener Piroplasmen	156

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AIC	Akaike Informationskriterium
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
Bosnien-Hzgj.	Bosnien und Herzegowina
C	Cytosin
<i>Cand.</i>	<i>Candidatus</i>
CEA	Critical Equilibrium Activity
(c)ELISA	(kompetitiver) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic Acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Dtl.	Deutschland
et al.	Lateinisch: et alii (und andere)
FP	Vorwärtsprimer
FU	Freie Universität Berlin
G	Guanin
g	Gramm
× g	Fallbeschleunigung (Erdbeschleunigung: 9,81 m/s ²)
h	Stunde(n)
HRM	High Resolution Melting Curve Analysis
IFAT	Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörper-Test
IGS	Intergenic Spacer
ITS	Internal Transcribed Spacer
kb	Kilobase
KI	Konfidenzintervall
K. Wusterh.	Königs Wusterhausen
l	Liter
LB-Medium/-Agar	LB = lysogeny broth (Nährmedium/-agar für Bakterien)
M	Molar (mol/l)
Max	Maximum
min	Minute(n)
Min	Minimum
n	Stichprobengröße

Abkürzungsverzeichnis

NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Aktivität
RH	Relative Luftfeuchtigkeit (relative humidity)
RP	Rückwärtsprimer
rpm	revolutions per minute ("Umdrehungen pro Minute")
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
sec	Sekunde(n)
SENLAT	scalp eschar and neck lymph adenopathy after tick bite
s.l.	sensu lato
sp.	Species
spp.	Species pluralis
s.s.	sensu stricto
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA (Puffer)
Temp	Temperatur
U	Unit (Einheit)
u. a.	unter anderem
UK	United Kingdom (Vereinigtes Königreich)
USA	United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)
μ	Mikro
ø	arithmetisches Mittel

1 Einleitung

Durch zeckenübertragene Erreger hervorgerufene Erkrankungen sind von zunehmender Relevanz im Bereich der Human- und Veterinärmedizin. *Dermacentor reticulatus* bildet nach *Ixodes ricinus* die zweithäufigste Zeckenart in Europa. Die Zeckenspezies erfuhr aufgrund ihrer geografischen Ausbreitung von den endemischen Gebieten in Süd- und Südosteuropa in nahezu alle europäischen Länder im Bereich zwischen 41°-57° nördlicher Breite immensen Bedeutungszuwachs (Rubel et al. 2016). In Deutschland kam *D. reticulatus* bis in die siebziger Jahre nur vereinzelt im Süden vor. Heute hat sich ihr Vorkommen auf nahezu alle Bundesländer ausgeweitet (Heile et al. 2006, Rubel et al. 2016). Annähernd gleiche Infestationsraten von Hunden mit *D. reticulatus* und *I. ricinus* verdeutlichen ihre große Relevanz auch im Raum Berlin (Beck et al. 2014). Eine weitere Bedeutung besteht darin, dass adulte Stadien neben den primären Aktivitätszeiten im Frühjahr und Herbst z. T. auch in den Wintermonaten auftreten. Zum besseren Verständnis der Zeckenaktivität wurden in verschiedenen Studien potentielle, insbesondere abiotische Einflussfaktoren untersucht und die Bedeutung der Temperatur herausgestellt (Bartosik et al. 2012, Zając et al. 2016). Die Auswertung erfolgte mithilfe univariater Tests und damit ohne zusammenhängende Betrachtung der einzelnen Faktoren.

Mit der geografischen Verbreitung der Vektorzecke besteht die Gefahr der Ausbreitung zeckenübertragener Krankheitserreger. *Dermacentor reticulatus* gilt nachweislich als Überträger von *Babesia canis*, *Babesia caballi*, *Theileria equi*, *Anaplasma marginale*, *Rickettsia slovaca* und *Rickettsia raoultii*. Diese Pathogene lösen bei Hunden, Pferden, Wiederkäuern und Menschen z. T. schwerwiegende Krankheitsbilder aus. Ein bedeutendes Beispiel für die Ausbreitung zeckenübertragener Erkrankungen ist die im Zusammenhang mit *D. reticulatus* beschriebene canine Babesiose. Früher ausschließlich als Reiseerkrankung deklariert, tritt sie heute zunehmend autochthon in nahezu allen Bundesländern Deutschlands und auch im Raum Berlin auf (Barutzki et al. 2007). Untersuchungen von Buntzecken fanden bislang nur vereinzelt statt und konnten den Erreger trotz gehäufte Krankheitsfälle nur in einem Gebiet in Süddeutschland nachweisen (Beelitz et al. 2012).

Anhand der caninen Babesiose ist die lückenhafte Informationslage zu zeckenübertragenen Pathogenen in *D. reticulatus* in Deutschland ersichtlich. Auch sind Faktoren, welche die Aktivität der Zecken beeinflussen, nicht ausreichend untersucht. Aus diesem Grund verfolgte die vorliegende Doktorarbeit das Ziel die Saisonalität von *D. reticulatus* im Raum Berlin zu bestimmen und ihre Aktivität unter Betrachtung potentieller räumlicher, temporaler und klimatischer Einflussfaktoren in einer Regressionsanalyse zu beurteilen. Darüber hinaus wurden die Prävalenzen von *Babesia* spp., *Borrelia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* und *Rickettsia* spp. in adulten Buntzecken bestimmt und deren Einflussfaktoren mithilfe der multivariaten Modellierung ermittelt.

2 Literaturübersicht

2.1 Überblick zur Buntzecke *Dermacentor reticulatus*

2.1.1 Systematik und Morphologie

Dermacentor reticulatus (Fabricius 1974), im allgemeinen Sprachgebrauch als Buntzecke oder auch Auwaldzecke bezeichnet, gehört innerhalb der Unterklasse der Acari (Zecken und Milben sensu stricto) zur Familie der Ixodidae (Schildzecken) (Deplazes et al. 2013b). Die adulten Stadien von *D. reticulatus* weisen einen ausgeprägten Geschlechtsdimorphismus auf. Im ungesogenen Zustand sind Männchen mit einer Körperlänge von 2,9-4,4 mm geringfügig größer als die weiblichen Vertreter (2,9-3,7 mm) (Immler 1973). Während der Blutmahlzeit wachsen die Weibchen bis auf 12 mm heran (Heile et al. 2006). Sie sind einheitlich braun gefärbt und tragen ein weiß-braun gemustertes Scutum. Da dieses beim Männchen das gesamte Idiosoma bedeckt, erscheinen diese auffällig bunt gezeichnet. *Dermacentor reticulatus* weist in Höhe des zweiten Beinpaars ein Augenpaar auf, das der Zecke neben anderen Reizeinflüssen bei der Wirtssuche hilft. Die sechsbeinigen Larven sind im ungesogenen Zustand mit einer Körperlänge von durchschnittlich 0,5 mm weitaus kleiner als die achtbeinigen, noch ungeschlechtlichen Nymphen mit einer Körperlänge von 1 mm (Immler 1973). Eine Abgrenzung der adulten Stadien zu anderen Zeckengattungen ist mit dem bloßen Auge möglich. Im Gegensatz dazu ist für die Differenzierung zur ebenfalls in Deutschland verbreiteten Schafzecke *Dermacentor marginatus* die Verwendung eines Stereomikroskops notwendig. So ist bei *D. reticulatus* im Bereich des zweiten Palpengliedes der Mundwerkzeuge ein nach kaudal gerichteter Dorn ausgebildet. Zudem wird die tief eingeschnittene Coxa I mit ihrem vergleichsweise kräftigen Dorn für die Speziesunterscheidung herangezogen (Babos 1964).

2.1.2 Geografische Verbreitung und Habitate

Dermacentor reticulatus kommt in weiten Teilen der gemäßigten Klimazone Europas und Asiens mit einer mittleren Sommertemperatur von 20-22 °C und einer jährlichen Niederschlagsmenge von 400-1000 mm vor (Immler 1973). Das Verbreitungsgebiet reicht aktuell in seiner West-Ost-Ausdehnung von Nordportugal bis zum Verlauf des Flusses Jenissei in Sibirien und in seiner Nord-Süd-Ausdehnung von Lettland (57° N) bis Südspanien (41° N). In diesem Gebiet sind nahezu alle europäischen Länder von *D. reticulatus* besiedelt, wobei die Verteilung durch ein fokales Auftreten gekennzeichnet ist (Estrada-Peña et al. 2013a, Rubel et al. 2016). Die Diagnose eines autochthonen Babesiosefalles bei einem Hund im Gebiet von Oslo (60° N) (Øines et al. 2010) zeigt jedoch, dass das Vorkommen der

Zecke fortlaufend untersucht werden sollte. Immerhin beschreiben zahlreiche Studien eine Ausweitung des Lebensraumes dieser Zeckenspezies (Sréter et al. 2005, Bullová et al. 2009, Zygner et al. 2009, Chitimia-Dobler 2015, Paulauskas et al. 2015, Mierzejewska et al. 2016, Medlock et al. 2017). Auch in Deutschland hat sich *D. reticulatus* von den einst fokal beschriebenen Vorkommensgebieten in Bamberg (Schulze 1925), Dessau (Eichler 1959), Potsdam (Negrobov und Borodin 1964) und der deutschen Rheingrenze bei Basel (Immler 1973) in nahezu alle Landesteile ausgebreitet (Dautel et al. 2006, Rubel et al. 2016). Als Gründe für die vielerorts beobachtete zunehmende Verbreitung werden zum einen wärmere Sommer, die die Entwicklung der Prämarginalstadien begünstigen, sowie mildere Winter infolge des Klimawandels angeführt. Zum anderen wird die Globalisierung durch Handel und Tourismus, welche die Gefahr der Verschleppung von Zecken in bislang freie Gebiete birgt, diskutiert. Der geringere Einsatz von Schädlingsbekämpfungsmitteln wird ebenfalls angeführt. Die vermehrte Schaffung von Naturschutz- und Naherholungsgebieten sowie von brachliegenden Flächen im Zuge der Renaturierungsmaßnahmen im Rahmen der Gemeinsamen Agrarpolitik der Europäischen Union erzeugte Lebensraum sowohl für *D. reticulatus* als auch für potentielle Wirte (Heile et al. 2006, Karbowiak 2014). Mierzejewska et al. (2017) heben ebenfalls die Bedeutung der Landschaftsstruktur hervor und propagiert die Ausbreitung der Zecke durch den Rückgang walddreicher Flächen.

Dermacentor reticulatus ist in einer Vielfalt verschiedener Vegetationsformen angesiedelt, die eine gewisse Feuchtigkeit und intensive Sonneneinstrahlung bieten (Dautel et al. 2006, Heile et al. 2006). So werden Funde im Bereich von Flussgebieten, Sumpfniederungen, feuchten Biotopen in Misch- und Auwäldern, aber auch auf Wiesen und Heiden, an Waldkanten, Waldwegen und in Dünenlandschaften mit ausreichender Niederschlagsmenge beschrieben (Földvári et al. 2016). Andere Autoren beschreiben hingegen Funde in überaus trockenen Gebieten (Hornok und Farkas 2009). *Dermacentor reticulatus* bevorzugt vom Menschen unberührte Flächen, ist aber auch in bewirtschafteten Gebieten wie z. B. Stadtparks gelegentlich anzutreffen (Zahler et al. 2000, Heile et al. 2006, Biaduń 2011, Hornok et al. 2014).

2.1.3 Entwicklungszyklus und Wirtsspektrum

Die Entwicklung von *D. reticulatus* verläuft vom embryonierten Ei, über jeweils ein Larven- und Nymphenstadium zum geschlechtlich differenzierten Imago. Die Prämarginalstadien parasitieren in erster Linie an Kleinsäugetern wie Insektenfressern, Musteliden und Nagern (Földvári et al. 2016), wobei sie eine Wirtspräferenz insbesondere gegenüber der Rötelmaus (*Myodes glareolus*) aufweisen (Immler 1973, Paziowska et al. 2010). Wirte adulter Stadien sind v. a. Hunde, Pferde und Cerviden, aber auch Hauswiederkäuer, Füchse, Wildschweine,

Hasen, Igel und sogar der Mensch (Bauch und Danner 1988, Drózd and Bogdaszewska 1997, Dautel et al. 2006, Ruiz-Fons et al. 2006, Földvári et al. 2013, Földvári et al. 2016). Dieser Ditropismus der Entwicklungsstadien hat zur Folge, dass sich die Prämarginalstadien in Erdbodennähe und die Imagines in erster Linie auf der Vegetation zur Wirtssuche aufhalten. Mithilfe des Hallerschen Organs machen sie den Wirt aufgrund von Erschütterungen, CO₂, Beschattung und Wärme ausfindig (Immler 1973). Nach der Blutmahlzeit fallen die gesogenen Stadien vom Wirt ab und entwickeln sich in der Umwelt durch Häutung zur nächsten Entwicklungsstufe. Die Kopulation der Imagines erfolgt auf dem Wirt. Voraussetzung hierfür ist die vorangegangene Blutaufnahme der Männchen (6,5 mg). Weibliche Zecken entziehen dem Wirt Blutmengen von ca. 330–530 mg (Immler 1973). In den Frühjahrsmonaten aktive weibliche Zecken legen nach einer Saugzeit von 8-15 Tagen (Heile et al. 2006) 2000-5000 Eier (Immler 1973, Slovák et al. 2002). Im Herbst aktive Zecken verzögern die Eiablage klimatisch bedingt größtenteils bis in das nächstfolgende Frühjahr (Immler 1973). Die daraus hervorgehenden Prämarginalstadien entwickeln sich noch im selben Jahr zur adulten Form, sodass ein kompletter Entwicklungszyklus von *D. reticulatus* nach 1-1,5 Jahren abgeschlossen ist (Heile et al. 2006).

2.1.4 Saisonale Aktivität

Sämtliche Stadien von *D. reticulatus* zeigen ein charakteristisches saisonales Verteilungsmuster. Die Imagines zeichnen sich durch einen biphasischen jährlichen Aktivitätsanstieg aus und treten ungefähr in den Zeiträumen März bis Mai und September bis November auf (Immler 1973, Széll et al. 2006, Bartosik et al. 2011, Duscher et al. 2013). Während der Sommermonate ziehen sich die adulten Stadien aufgrund einer vollzogenen Blutmahlzeit oder zu warmer und trockener Bedingungen i. d. R. in feuchte Erdschichten zurück (Martinod und Gilot 1991, Heile et al. 2006). Alternierend dazu wurden Larven v. a. von Ende Mai bis Ende Juli/Mitte August und Nymphen von Juli bis September auf Wirtstieren gefunden (Immler 1973, Szymański 1987, Paziewska et al. 2010, Pfäffle et al. 2015). Generell überwintern adulte *D. reticulatus* in den Laub- und Mooschichten (Heile et al. 2006). Allerdings wurden immer wieder Funde auf der Vegetation und auf Wirtstieren im Zeitraum Dezember bis Februar dokumentiert (Földvári und Farkas 2005, Széll et al. 2006, Dautel et al. 2008, Buczek et al. 2014, Chitimia-Dobler 2015, Kiewra et al. 2016). Hornok (2009) begründet dies mit ungewöhnlich milden klimatischen Bedingungen bzw. abrupt ansteigenden Temperaturen.

Grundsätzlich sind adulte Buntzecken über eine große Spanne verschiedener Temperatur- und Luftfeuchtigkeitswerte aktiv. Bartosik et al. (2011) beobachteten ein verstärktes Vorkommen adulter Stadien in einem Temperaturbereich von 4-21 °C und einer relativen

Luftfeuchtigkeit von 61-100 %. Auch experimentell wurde die große Toleranz gegenüber diesen beiden Parametern belegt, wobei die Überlebensrate der Zecken mit ansteigender Luftfeuchtigkeit positiv korreliert (Zahler und Gothe 1995b, Meyer-König et al. 2001a). Verschiedene Feldstudien beweisen die Beeinflussung der Zeckenaktivität durch den Faktor Temperatur (Bartosik et al. 2011, Zając et al. 2016). Bezüglich der relativen Luftfeuchtigkeit kommen die Autoren jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen (Hubálek et al. 2003a). Die klimatischen Bedingungen für die Entwicklung der Prämarginallstadien unterliegen einer geringeren Spannbreite und zeigen unter experimentellen Bedingungen ein Optimum bei 10-27 °C und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit (Zahler und Gothe 1995a, Bartosik et al. 2011).

2.1.5 Vektorpotenzial

Dermacentor reticulatus ist nach *I. ricinus* die häufigste in Zentraleuropa gefundene Zeckenspezies und als weiterer bedeutender Träger und Vektor verschiedenster human- und zoopathogener Erreger bekannt (Rubel et al. 2016). Pathogene für die eine Vektorfunktion durch *D. reticulatus* bereits bestätigt wurde, sind *Babesia canis*, *Babesia caballi*, *Theileria equi*, *Anaplasma marginale*, *Rickettsia raoultii*, *Rickettsia slovaca* und das Omsk Hämorrhagische Fieber Virus. Darüber hinaus wurde die Buntzecke als Träger verschiedener Viren (z. B. Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus, Blauzungenvirus, Kemerovo-Virus), Bakterien (z. B. *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Rickettsia helvetica*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp., *Francisella tularensis* und *-philomiragia*) und Protozoen (z. B. *Babesia microti*, *Babesia bigemina*, *Babesia divergens*) beschrieben. Inwieweit *D. reticulatus* eine Rolle in der Epidemiologie dieser Erreger spielt, ist zumeist nicht ausreichend geklärt, da notwendige experimentelle Untersuchungen zu einer möglichen Vektorfunktion fehlen und der alleinige Nachweis von Erregermaterial in der Zecke keine Aussage zur Fähigkeit diese auf den Wirt zu übertragen, zulässt (Földvári et al. 2016, Rubel et al. 2016).

2.2 Untersuchte Erreger

2.2.1 Im Zusammenhang mit *Dermacentor reticulatus* beschriebene Piroplasmen

2.2.1.1 Systematik und Morphologie

Die Ordnung der Piroplasmida, welche dem Stamm der Apicomplexa angehört, enthält u. a. verschiedenste Vertreter der Hämoparasiten *Babesia* und *Theileria*, deren Systematik innerhalb der Ordnung jedoch nicht abschließend geklärt scheint (Lack et al. 2012, Schnittger et al. 2012). Jüngste phylogenetische Auswertungen lassen acht verschiedene

Gruppen erkennen, die möglicherweise eigenständige Gattungen darstellen. Darunter befinden sich beispielsweise Gruppe I, welche die meisten Babesien umfasst, Gruppe II, welche *T. equi* beinhaltet, Gruppe III, welche eine Vielzahl an Theilerien beherbergt, und Gruppe VI, welche der *B. microti*-Gruppe entspricht (Lack et al. 2012). Die im Zusammenhang mit *D. reticulatus* beschriebenen Piroplasmen werden Gruppe I, II und VI zugeordnet. Demnach überträgt *D. reticulatus* *B. canis*, *B. caballi* und *T. equi*. Darüber hinaus wurden zahlreiche Funde von *B. microti* dokumentiert (Földvári et al. 2016).

Die Morphologie der Babesien und Theilerien variiert in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium. Die in den Säugererythrozyten befindlichen Merozoiten unterscheiden sich in ihrer Gestalt (Babesien: tropfenförmig, Theilerien: stäbchenförmig bis oval), anhand der Lage in der Blutzelle (marginal, zentral) und in dem Winkel zwischen den Merozoiten (spitz, stumpf). Aufgrund der Merozoitengröße werden große Babesien (>2,5 µm) bzw. Theilerien und kleine Babesien (<2,5 µm) unterschieden. *Babesia canis* und *B. caballi* gehören zu den großen Babesien und sind im Blutausstrich durch die zentrale Lage der spitz gewinkelten Merozoiten erkennbar. Merozoiten von *T. equi*, welche zu einem charakteristischen Malteserkreuz angeordnet sind, weisen eine Größe von 0,8-2 µm auf (de Waal 1992, Schnittger et al. 2012, Deplazes et al. 2013a, Lempereur et al. 2017).

2.2.1.2 Verbreitung und Entwicklungsweg (Vektoren, Wirte, Reservoir)

Babesien und Theilerien sind weltweit verbreitet. Zu den wichtigsten in Europa dokumentierten Spezies gehören u. a. *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Babesia divergens*, *Babesia major*, *Babesia ovis*, *Babesia motasi*, *Babesia capreoli*, *Babesia venatorum*, *Babesia vogeli*, *Babesia* cf. *microti* (= *Theileria annae*), *B. microti*, *B. caballi*, *B. canis* und *T. equi* (Deplazes et al. 2013a). Im Folgenden werden die vier letztgenannten Vertreter, welche häufig im Zusammenhang mit *D. reticulatus* beschrieben wurden, näher erläutert.

Babesia canis wird ausschließlich durch *D. reticulatus* übertragen und ist entsprechend dem Verbreitungsgebiet der Vektorzecke in Europa und Asien zu finden (Földvári et al. 2016). Die Transmission von *T. equi* und *B. caballi* erfolgt neben *D. reticulatus* auch durch andere *Dermacentor*-, *Hyalomma*- und *Rhipicephalus* spp. Die Pathogene sind in (sub)tropischen Gebieten endemisch, werden aber auch in gemäßigten Klimaten beschrieben. Demzufolge sind *B. caballi* und *T. equi* in vielen Gebieten Asiens, Amerikas, Afrikas und Europas zu finden (Rothschild 2013, Scoles und Ueti 2015). *Babesia microti* ist in Amerika, Europa und Asien verbreitet und wird in erster Linie durch *Ixodes scapularis* (Amerika), *I. ricinus* (Europa) und *Ixodes persulcatus* (Asien) übertragen (Yabsley und Shock 2013, Zhou et al. 2014). Gehäufte Funde des Erregers in *D. reticulatus* geben zudem Anlass die Rolle der Zecke bezüglich einer möglichen Vektorfunktion zu hinterfragen (Földvári et al. 2016).

Literaturübersicht

Der Entwicklungszyklus von *Babesia* und *Theileria* spp. ist zum großen Teil identisch. In der Zecke erfolgt die Bildung infektiöser Sporozoiten durch Gamogonie und Sporogonie. Nach der Übertragung durch den Stich einer Zecke, bilden die Sporozoiten charakteristische Merozoiten in den Zielzellen der Vertebraten, welche sich ihrerseits weiter vermehren (Merogonie). Zielzellen aller *Babesia* und *Theileria* spp. bilden dabei die Erythrozyten im Wirbeltierwirt. Theilerien infizieren während einer präerythrozytären Phase zunächst Lymphozyten (Uilenberg 2006, Deplazes et al. 2013a). Eine Übertragung auf den Wirt erfolgt erst nach einem Zeitraum von 2 (*B. canis*) bzw. 2-5 (*T. equi*) Tagen. Männliche Buntzecken, welche die Fähigkeit zur mehrmaligen Blutaufnahme besitzen, können die Infektion hingegen unverzüglich weitergeben (Mehlhorn und Schein 1998, Heile et al. 2007, Varloud et al. 2018). Zudem liegen Beschreibungen zu einer iatrogenen Übertragung durch kontaminierte Instrumente (*B. caballi*, *T. equi*) und zu einer diaplazentaren Infektion des Ungeborenen (*B. canis*, *T. equi*) vor (de Waal 1992, Phipps und Otter 2004, Allsopp et al. 2007, Georges et al. 2011, Mierzejewska et al. 2014). In Bezug auf *B. microti* wurde gehäuft von Infektionen durch Bluttransfusionen berichtet (Hildebrandt et al. 2007, Leiby 2011).

Der Hauptwirt für *B. canis* ist der Hund. Selten wurden positive Proben auch aus Füchsen und Wölfen gezogen (Földvári et al. 2016). Für *B. caballi* und *T. equi* stellen Zebras, Pferde, Esel und deren Kreuzungen primäre Wirte dar (de Waal 1992). *Babesia microti* präferiert hingegen kleine Nagetiere und Insektivoren (Altwelt-, Spitz- und Weißfußmäuse). Infektionen im Menschen werden jedoch auch beschrieben (Yabsley und Shock 2013).

Innerhalb der Zeckenpopulation werden Babesien transstadial und zum Großteil auch transovariell weitergegeben. Einige Vertreter, wie z. B. *B. microti*, *Babesia duncani*, *Babesia conradae*, aber auch die gesamte Gruppe der Theilerien werden hingegen ausschließlich transstadial weitergegeben. Unter den ausschließlich transstadial übertragenen Erregern wurde z.T. ein Erlöschen der Infektion in der Zecke nach Übertragung auf den Wirt beobachtet (Uilenberg 2006, Schnittger et al. 2012, Deplazes et al. 2013a).

Aufgrund der transovariellen Übertragung dienen die Vektorzecken selbst als Reservoir für *B. canis* und *B. caballi*. Zudem fungieren Equiden oftmals als Reservoir, da die Erreger trotz überstandener Erkrankung jahre- bzw. lebenslang im Wirt persistieren können (de Waal 1992, Uilenberg 2006, Ueti et al. 2012). Für *B. canis* scheinen chronisch oder subklinisch erkrankte Hunde ebenfalls Reservoirfunktion zu übernehmen (Vial und Gorenflot 2006, Földvári et al. 2016). Kleine Nagetiere und Insektivoren bilden hingegen das bislang einzige bekannte Reservoir für *B. microti* (Yabsley und Shock 2013).

2.2.1.3 Prävalenzen von Piroplasmen in wirtssuchenden *Dermacentor reticulatus*

Zahlreiche in wirtssuchenden *D. reticulatus* durchgeführte Untersuchungen zur Prävalenz von Babesien, aber auch von Theilerien, lassen große Differenzen in Abhängigkeit vom Untersuchungsgebiet erkennen (Tab. 1). Ost- und südosteuropäische Studien konnten in nahezu allen Fällen Babesien nachweisen, wobei Prävalenzen bis zu 21,6 % ermittelt wurden (Mihaljica et al. 2012, Tomanović et al. 2013). In West- und Zentraleuropa wurden dagegen kaum Infektionen mit Babesien bzw. Theilerien detektiert. In Deutschland wurden in bislang drei großen Studien ausschließlich im Saarland Babesien-positive wirtssuchende *D. reticulatus* mit einer Prävalenz von 2,5 % nachgewiesen (Beelitz et al. 2012, Silaghi et al. 2012a, Weis 2014).

Tab. 1: Prävalenzen von *Babesia* und *Theileria* spp. in wirtssuchenden *D. reticulatus*. Es wurden nur Studien mit einer Stichprobengröße von $n \geq 50$ berücksichtigt.

Land	Prävalenz	Spezies	Referenz
Deutschland	0-2,5 %	<i>B. c.</i>	Silaghi et al. (2012a); Beelitz et al. (2012); Weis (2014)
Niederlande/ Belgien	0-1,87 %	<i>B. c.</i> , <i>B. cab.</i>	Nijhof et al. (2007); Jongejan et al. (2015); Hofmeester et al. (2016); Cochez et al. (2012)
Großbritannien	13,4 %	<i>B. c.</i>	de Marco et al. (2017)
Frankreich	0 %		Bonnet et al. (2013)
Spanien	6,2 %	<i>B. c.</i> , <i>B. cab.</i> , <i>B.</i> und <i>T.</i> spp. ^{a)}	García-Sanmartín et al. (2008)
Österreich	0-10 %	<i>B. c.</i> , <i>B. cf. mic.</i>	Duscher et al. (2016); Hodžić et al. (2017)
Lettland	2,8 %	<i>B. c.</i> , <i>B. ven.</i>	Radzijeuskaja et al. (2017)
Litauen	1,2 %	<i>B. c.</i>	Radzijeuskaja et al. (2017)
Polen	0-4,5 %	<i>B. c.</i> , <i>B. mic.</i>	Wójcik-Fatla et al. (2012); Wójcik-Fatla et al. (2015); Mierzejewska et al. (2015b); Opalińska et al. (2016); Król et al. (2016a); Zając et al. (2017)
Tschechien/ Slowakei	0-3,2 %	<i>B. c.</i>	Duh et al. (2006); Rybářová et al. (2017); Kubelová et al. (2011); Svehlová et al. (2014)
Serbien	20,8-21,6 %	<i>B. c.</i>	Mihaljica et al. (2012); Tomanović et al. (2013)
Ungarn	8,2 %	<i>B. c.</i>	Hornok et al. (2016)
Ukraine	0-5,1 %	<i>B. c.</i> , <i>B. odoc.</i>	Karbowiak et al. (2014); Didyk et al. (2017); Rogovskyy et al. (2018)
Weißrussland	0 %		Reye et al. (2013)
Russland	3,6-4,17 %	<i>B. c.</i>	Rar et al. (2005a); Rar et al. (2005b)

B. c. = *B. canis*, *B. cab.* = *B. caballi*, *B. mic.* = *B. microti*, *B. ven.* = *B. venatorum*, *B. odoc.* = *B. odocoilei*;

^{a)} *B. divergens*, *B. bigemina*, *T. equi*, *Theileria* sp. OT1

Tabelle 1 zeigt, dass die Speziesbestimmung positiver Proben in der Mehrheit *B. canis* entspricht. Zudem wurden die für *D. reticulatus* bedeutenden Erreger *B. caballi* und *T. equi* in geringer Anzahl detektiert. Auffällig sind auch die zunehmend beschriebenen Fälle von *B. microti*-Infektionen. Die von Michelet et al. (2016) detektierte *B. bovis*-Infektion ist aufgrund der geringen Stichprobengröße der Studie (n=29) nicht in Tab. 1 aufgeführt. Funde von *Babesia odocoilei* gelten zudem als Erstbeschreibung in *D. reticulatus* (Rogovskyy et al. 2018).

2.2.1.4 Krankheitsbilder bei Mensch und Tier

Die canine Babesiose infolge einer *Babesia canis*-Infektion

Babesia canis ist weltweit einer der sieben Auslöser der caninen Babesiose und stellt in Europa die bedeutendste Spezies dar (Schnittger 2012, Solano-Gallego et al. 2016). Infolge der Ausbreitung der Vektorzecke *D. reticulatus* gewinnt *B. canis* zunehmend an Bedeutung. Die ursprünglich nur im mediterranen und osteuropäischen Raum endemische Erkrankung tritt vermehrt in bislang babesiosefreien Ländern wie z. B. Norwegen, Großbritannien und Deutschland auf (Heile et al. 2006, Leschnik et al. 2008, Øines et al. 2010, Sánchez-Vizcaíno et al. 2016, de Marco et al. 2017) und kommt mittlerweile in fast allen Ländern Europas vor (Solano-Gallego et al. 2016). Erkrankungsfälle korrelieren mit der Aktivität der adulten Stadien von *D. reticulatus* und treten folglich verstärkt in den Frühjahrs- und Herbstmonaten auf (Porchet et al. 2007, Schaarschmidt et al. 2013). Es werden unterschiedlich starke Ausprägungen der Erkrankung beobachtet, was möglicherweise in der unterschiedlichen Virulenz verschiedener *B. canis*-Stämme begründet liegt. Die Infektion kann subklinisch, perakut, akut oder chronisch verlaufen. Die akute Verlaufsform äußert sich durch hohes Fieber, Inappetenz, Gewichtsverlust, Splenomegalie und Hypotension. Labordiagnostische Veränderungen sind u. a. durch eine fortschreitende hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und Hämoglobinurie gekennzeichnet. Infolge einer inadäquaten generalisierten systemischen Entzündungsantwort (SIRS) können Komplikationen auftreten, welche u. a. Leberfunktionsstörungen, respiratorische und zentralnervöse Erscheinungen, Muskelentzündungen, Koagulopathien, ein akutes Nierenversagen, Schockzustände bis hin zum Multiorganversagen und Todesfälle umfassen. Bei einem perakuten Verlauf tritt dieses Krankheitsbild innerhalb von 24 Stunden nach Beginn der ersten Symptome auf. Chronische Infektionen können zu Rückfällen in Form von rezidivierendem Fieber, Abmagerung und Leberinsuffizienz führen (Matijatko et al. 2010, Niemand et al. 2011a, Matijatko et al. 2012).

Die equine Piroplasmose infolge einer *Babesia caballi*- oder *Theileria equi*-Infektion

Die durch *T. equi* oder *B. caballi* ausgelöste equine Piroplasmose kommt weltweit vor und ist in (sub)tropischen, aber auch in manchen gemäßigten Klimaten endemisch. Nichtendemische Gebiete umfassen u. a. Nordeuropa, Großbritannien, Irland, die USA, Kanada, Japan, Australien und Neuseeland (Rothschild 2013). In Europa gibt es Berichte von PCR- bzw. seropositiven Tieren aus nahezu allen süd- und osteuropäischen Ländern. In Deutschland bleibt die Diagnose einer autochthonen akuten *T. equi*-Infektion bislang eine Einzelfallbeschreibung (Scheidemann et al. 2003). Anhand der Klinik kann eine Infektion mit *T. equi* nicht von der einer *B. caballi*-Infektion unterschieden werden, allerdings verursacht *T. equi* häufig einen schwerwiegenderen Verlauf. Aufgrund gemeinsamer Vektoren und einer fehlenden Kreuzimmunität treten die Erreger oft simultan auf (de Waal 1992, Mehlhorn und Schein 1998). Die Mehrheit der Tiere durchläuft eine inapparente Infektion und bildet damit ein Reservoir für die Erreger. Darüber hinaus können Stuten *T. equi* auf das Ungeborene übertragen (Rothschild 2013). Intrauterine Infektionen können zu Aborten, Totgeburten oder einer neonatalen Piroplasmose bei lebend geborenen Fohlen führen (de Waal 1992, Georges et al. 2011). Grundsätzlich kann die Erkrankung chronisch, subklinisch, akut oder perakut verlaufen. Die akute Verlaufsform tritt dabei am häufigsten auf und ist durch Symptome wie Fieber, Gewichtsverlust, Ikterus, Tachykardien, Tachypnoe, Ödeme, Konstipation, Kolik sowie einer Hepato- und Splenomegalie gekennzeichnet. Labordiagnostisch steht eine Anämie, Hämoglobinurie und Bilirubinurie im Vordergrund. Todesfälle werden ebenfalls beschrieben. Die sehr selten auftretende perakute Form kann sich im Fall von immunsuppressiven Umständen, bei in utero infizierten Tieren oder bei besonders empfänglichen Tieren aus nicht endemischen Gebieten entwickeln (Zobba et al. 2008, Rothschild 2013, OIE 2014). Trotz überstandener Erkrankung persistiert der Erreger oft im Wirt (Ueti et al. 2012).

Die humane Babesiose infolge einer *Babesia microti*-Infektion

Die humane Babesiose kommt weltweit vor (Yabsley und Shock 2013). Auslöser sind neben *B. microti* u. a. *B. venatorum*, *B. divergens* und *B. duncani*. *Babesia microti* ist für die meisten Krankheitsfälle in den USA verantwortlich, spielt in Europa aber eine untergeordnete Rolle (Rozej-Bielicka et al. 2015). In Europa wurden *B. microti*-induzierte Fälle bislang nur in Deutschland und Polen nachgewiesen. Klinisch treten Fieber, Brustkorbschmerzen, eine Anämie, Leukopenie und Thrombozytopenie auf. Bei immunkompetenten Patienten war die Erkrankung selbstlimitierend (Hildebrandt et al. 2007, Moniuszko-Malinowska et al. 2016). In Nordamerika beschriebene Infektionen reichen von asymptomatischen bis hin zu ernsthaften Erkrankungen mit teils fatalem Ausgang durch Multiorganversagen. Die Erkrankung zeigt sich durch grippeähnliche Symptome mit Fieber, Kopf-, Gelenks- und Muskelschmerzen,

Ausschlag, Husten und Übelkeit. Schwerwiegende Verläufe werden i. d. R. bei immunsupprimierten oder splenektomierten Patienten beobachtet (Yabsley und Shock 2013, Rozej-Bielicka et al. 2015).

2.2.1.5 Diagnose, Therapie- und Präventionsmaßnahmen

Diagnose

Die labordiagnostische Bestätigung eines Babesiose- bzw. Piroplasmose-Verdachts erfolgt bei Hund, Pferd und Mensch jeweils durch Mikroskopie, Serologie und Molekularbiologie, wobei die Verfahren bei den genannten Erregern unterschiedliche Gewichtung haben. Die mikroskopische Bestimmung einer Infektion erfolgt in der akuten Phase im Giemsa-gefärbten Blutaussstrich. Niedrige Parasitämien und die morphologische Ähnlichkeit bestimmter *Babesia* spp. bergen die Gefahr der Fehlinterpretation. Zum Nachweis von *B. caballi* und *T. equi* gibt die World Organization of Animal Health (OIE) einen kompetitiven Enzyme-linked Immunosorbent Assay (cELISA) vor, welcher das lange Zeit verwendete Verfahren der Komplementbindungsreaktion (KBR) ablöst (OIE 2014). Zur Detektion von *B. canis* und *B. microti* sind sowohl zuverlässige serologische (cELISA, Indirekter Immunfluoreszenz Antikörper-Test = IFAT) als auch molekularbiologische Verfahren vorhanden (Rothschild 2013, Yabsley und Shock 2013, Rozej-Bielicka et al. 2015, Vannier et al. 2015, Solano-Gallego et al. 2016).

Therapie und Prävention

Das Mittel der Wahl zur Therapie der caninen (*B. canis*) bzw. equinen Piroplasmose ist der Wirkstoff Imidocarb Dipropionat. Alternativ dient auch Diminazen-Azeturat zur Behandlung der Babesien. Beim Pferd kann trotz Behandlung eine 100%ige Erregerelimination nicht gewährleistet werden (Rothschild 2013). Da in Deutschland aktuell keiner dieser Wirkstoffe zugelassen ist (<http://www.barsoiliste.de/>; Stand 02.08.2018), darf die Einfuhr und Anwendung nur im Rahmen des „Therapienotstandes“ (§ 56a, Abs. 2, Arzneimittelgesetz) erfolgen. Die Therapie der humanen Babesiose (*B. microti*) erfolgt mit den Arzneimittelkombinationen Atovaquon/Azithromycin bzw. Clindamycin/Chinin (Vannier et al. 2015). Präventiv stehen bei Mensch und Pferd keine Impfstoffe zur Verfügung. Für den Hund ist der Impfstoff Pirodog von Merial in der EU verfügbar, allerdings ist auch dieser in Deutschland nicht zugelassen (<http://www.pei.de/>; Stand 27.07.2018). Zudem gewährleistet die prophylaktische Gabe von Imidocarb Dipropionat einen ca. vierwöchigen Schutz vor einer Erkrankung (Naucke 2008).

2.2.2 Im Zusammenhang mit *Dermacentor reticulatus* beschriebene *Borrelia* spp. mit dem Schwerpunkt *Borrelia burgdorferi* sensu lato

2.2.2.1 Systematik und Morphologie

Borrelien sind gramnegative, helikal geformte Bakterien mit einer Größe von 8-30 µm × 0,2-0,5 µm (Barbour und Hayes 1986). Sie gehören zur Ordnung der Spirochaetales. Die weiterführende Taxonomie wird derzeit stark diskutiert. Einige Autoren unterstützen die bislang bekannten Vorstellungen, wonach die Familie der Spirochaetaceae die Gattung *Borrelia* beherbergt, welche wiederum die monophyletischen Gruppen des *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Komplexes (Lyme disease agent like-Borrelien) und des Rückfallfieber-Borrelien-Komplexes enthält (Casjens et al. 2010, Margos et al. 2017). Eine andere Systematik sieht hingegen die Familie der Borreliaceae vor, welche u. a. die eben genannten Gruppen umfasst, diese aber als eigenständige Gattungen betrachtet. Demnach werden die Gattungen *Cristispira*, *Borrelia*, welche die Rückfallfieber-Borrelien enthält, und die *Borrelia*, welche die Lyme-Borrelien beinhaltet, unterschieden (Adeolu und Gupta 2014, Barbour et al. 2017). Dem *B. burgdorferi* s.l.-Komplex gehören ungefähr 20 verschiedene Genospezies an (Radolf et al. 2012). Da *D. reticulatus* bislang ausschließlich im Zusammenhang mit Vertretern dieser Gruppe beschrieben wurde (Földvári et al. 2016, Rubel et al. 2016), wird in den folgenden Ausführungen primär auf diese eingegangen.

2.2.2.2 *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Komplex

2.2.2.2.1 Verbreitung und Entwicklungsweg (Vektoren, Wirte, Reservoir)

Das Hauptverbreitungsgebiet der Erreger des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes ist die gesamte nördliche Hemisphäre. Neben den dominierenden Genospezies *Borrelia afzelii* und *Borrelia garinii* wurden in Europa *Borrelia bavariensis*, *Borrelia bissettii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia spielmanii*, *Borrelia lusitaniae* und *Borrelia valaisiana* nachgewiesen (Rudenko et al. 2011). Vertreter dieses Komplexes werden in erster Linie durch *I. ricinus* und *I. persulcatus* (Europa und Asien) sowie durch *Ixodes pacificus* und *I. scapularis* (Nordamerika) übertragen (Margos et al. 2011). Darüber hinaus wurde die Fähigkeit zur Übertragung für eine Vielzahl weiterer *Ixodes* spp. wie z. B. *Ixodes hexagonus* und *Ixodes uriae* belegt (Oliver 1996, Gern 2008). Die Transmission durch *D. reticulatus* gilt als unwahrscheinlich (Richter et al. 2012b).

Unter den Vektorzecken ist jedes Entwicklungsstadium für eine Infektion mit Borrelien empfänglich (Skotarczak 2009, Radolf et al. 2012). Die Weitergabe der Erreger innerhalb der Zeckenpopulation erfolgt in erster Linie transstadial, aber auch das Co-feeding wird als Transmissionsweg diskutiert (Richter et al. 2002). Im Gegensatz zu den Rückfallfieber-

Borrelien werden Vertreter des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes nicht transovariell weitergegeben (Richter et al. 2012a). Die Reservoirfunktion übernehmen hingegen mehr als 100 Säugetierspezies (Margos et al. 2011), wobei die Genospezies Präferenzen zu unterschiedlichen Reservoiren zeigen. Während *B. burgdorferi* s.s. Nagetiere und Vögel als Reservoir nutzt, sind *B. garinii* und *B. valaisiana* primär in Vögeln und *B. afzelii*, *B. bissettii* sowie *B. bavariensis* in Nagetieren zu finden. *Borrelia lusitaniae* präferiert Vögel und Eidechsen, wohingegen *B. spielmanii* bislang nur in Gartenschläfern gefunden wurde (Schwarz et al. 2012, Richter et al. 2013). Darüber hinaus werden *Borrelia* spp. u. a. in Menschen, Cerviden, domestizierten Wiederkäuern, Hunden und Wildcarnivoren beschrieben. Diese übernehmen keine Reservoirfunktion. Stattdessen können z. B. Rinder als zooprophyktische Wirte zum Erlöschen der Infektion in der Zecke führen (Matuschka et al. 1993, Piesman und Gern 2004, Little et al. 2010, Richter und Matuschka 2010).

Die Übertragung auf den Wirt erfolgt mit dem Speichel. Da mit dem Anheften an den Wirt erst die Akquirierung der Erreger aus dem Mitteldarm der Zecke einsetzt, erfolgt die Übertragung erst einige Stunden nach Saugbeginn (Piesman 1993). Dabei sind Differenzen im Hinblick auf die Vektor- und Borreliengenospezies zu verzeichnen. Demnach wurde der Beginn der Übertragung nach 16-24 Stunden (*B. afzelii*) bzw. erst nach mehr als 48 Stunden (*B. burgdorferi* s.s.) beobachtet (Kahl et al. 1998, Crippa et al. 2002).

2.2.2.2 Krankheitsbilder, Diagnostik und Therapie

Krankheitsbilder bei Mensch und Hund

Lyme disease agent like-Borrelien führen zur Ausbildung der sogenannten Lyme-Borreliose, welche insbesondere im Menschen, Hund und Pferd, aber auch in Katzen, Schafen und Rindern beschrieben wurde (Bjarnadóttir 2007).

Die humane Lyme Borreliose ist die wichtigste arthropodenübertragene Erkrankung in Europa und Nordamerika (Bhide et al. 2004, Sykes und Makiello 2017). Während in Nordamerika *B. burgdorferi* s.s. als alleiniges Pathogen gilt, werden in Europa in erster Linie *B. afzelii* und *B. garinii*, aber auch *B. spielmanii*, *B. burgdorferi* s.s. und *B. bavariensis* als auslösende Erreger verantwortlich gemacht (Stanek et al. 2012). Im Fall einer Infektion bildet mit ca. 20 % ein hoher Anteil der Betroffenen eine klinisch manifeste Erkrankung aus (Robert-Koch-Institut 1999). In der Frühphase der Erkrankung zeigen sich häufig ein Erythema migrans (60-80 %) sowie Fieber, Kopf-, Muskel- oder Gelenkschmerzen. Mit der Dissemination des Erregers im Organismus treten Arthritiden, Erscheinungen des zentralen Nervensystems (Bannwarth-Syndrom), das Borrelien Lymphozytom oder seltener auch Karditiden auf. Diese Erscheinungen gehen mit der Spätphase der Erkrankung (Monate bis Jahre nach Infektionsbeginn) in die chronische Form der Neuroborreliose, Arthritis bzw.

Acrodermatitis chronica atrophicans über. Aufgrund der Präferenz der Genospezies für verschiedene Organsysteme wird *B. afzelii* mit Hautveränderungen, *B. garinii* mit neurologischen Erscheinungen und *B. burgdorferi* s.s. mit Arthritiden in Verbindung gebracht (Rizzoli et al. 2011, Biesiada et al. 2012, Stanek et al. 2012).

In Bezug auf die canine Borreliose gehen einige Autoren von einer Pathogenität durch *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii* aus (Zygner et al. 2008). Unter dem Gesichtspunkt der Kochschen Postulate kann jedoch ausschließlich *B. burgdorferi* s.s. als pathogen eingestuft werden (Pantchev et al. 2015). Dennoch wurde in symptomatischen Hunden von einer Infektion mit *B. garinii* berichtet (Inokuma et al. 2013). Der Status von *B. afzelii* bleibt weiterhin unklar, da dieser Erreger bislang ausschließlich in asymptomatischen Hunden nachgewiesen wurde (Alho et al. 2016, Dzięgiel et al. 2016). Die Seroprävalenzen in europäischen Hunden zeigen große Spannweiten und reichen in Abhängigkeit von der Untersuchungsgruppe (z. B. Haushund vs. Jagdhund) bis über 50 % (Bhide et al. 2004, Krupka et al. 2007, Pantchev et al. 2009, Kiss et al. 2011, Barth et al. 2012, Mircean et al. 2012, Berzina und Matise 2013, Mencke 2013). Der überwiegende Teil der Infektionen verläuft subklinisch. Klinische Fälle treten nach einer Inkubationszeit von 2-5 Monaten auf (Niemand et al. 2011b). Es bilden sich unspezifische Symptome in Form von Fieber, Anorexie, Lethargie und einer Lymphadenopathie aus. Infolge immunbedingter Reaktionen können sich insbesondere an den Karpal- und Tarsalgelenken Lahmheiten im Rahmen von Arthritiden einstellen. In Europa stellt die Glomerulonephritis die wichtigste Komplikation dar. Myokarditiden und neuronale Störungen wurden ebenfalls beschrieben (Skotarczak 2002, Little et al. 2010).

Diagnose, Therapie- und Präventionsmaßnahmen

Die Diagnose einer Borreliose wird bei Mensch und Tier durch die Verknüpfung von klinischen Symptomen, der Zeckenexposition und serologischen Untersuchungen gestellt (Pantchev et al. 2015, Cutler et al. 2017). In der Humanmedizin gilt das Erythema migrans als eindeutiges Erkrankungsmerkmal. Bei Verdachtsdiagnosen gilt ein Zweistufentest, bestehend aus einem ELISA und anschließendem Western Blot, als Mittel der Wahl (Cutler et al. 2017). Beim Hund findet bereits ein einstufiger sogenannter C6-ELISA Anwendung, welcher eine Differenzierung von vakzinierten und erkrankten Tieren sowie die Einschätzung des Therapieerfolges anhand der Antikörper-Verläufe zulässt (Philipp et al. 2001, O'Connor et al. 2004, Pantchev et al. 2015).

Zur Behandlung der humanen und caninen Borreliose werden Antibiotika, vorzugsweise das Tetracyclin Doxycyclin, eingesetzt. Darüber hinaus finden auch eine Reihe von β -Lactam Antibiotika, wie Amoxicillin und Ceftriaxon, Anwendung (Little et al. 2010, Biesiada et al. 2012, Wright et al. 2012). Präventiv stehen beim Hund folgende Impfstoffe zur

Verfügung: (1) *B. burgdorferi* s.s., (2) *B. afzelii*-*B. garinii*, (3) *B. burgdorferi* s.s.-*B. afzelii*-*B. garinii* (Pantchev et al. 2015). Aufgrund der wenig vorhandenen Kreuzreaktivitäten zu heterologen Genospezies wirken die Impfstoffe nur gegen die jeweils enthaltenen Erreger (Töpfer und Straubinger 2007). Im Humansektor befinden sich die Impfstoffe weiterhin in der Entwicklungsphase (Badawi et al. 2017, Zhao et al. 2017).

2.2.2.3 Rückfallfieber-Borrelien

Rückfallfieber-Borrelien sind weltweit verbreitet. Lederzecken der Gattung *Ornithodoros* fungieren in erster Linie als Vektor. Nur einzelne Genospezies werden durch Schildzecken (z. B. *Borrelia miyamotoi*) oder Läuse (*Borrelia recurrentis*) übertragen. In Europa wurden Funde von *Borrelia hispanica*, *Borrelia persica*, *Borrelia caucasica*, *Borrelia crocidurae*, *B. recurrentis* und *B. miyamotoi* beschrieben, wobei unter diesen ausschließlich *B. miyamotoi* in Schildzecken vorkommt (Talagrand-Reboul et al. 2018). Dabei gelten *Ixodes* spp. als Hauptüberträger (Siński et al. 2016). Beschreibungen in *D. reticulatus* liegen bislang nicht vor. Aufgrund der transovariellen Weitergabe des Erregers durch *Ixodes* Zecken gelten diese neben Kleinnagern aktuell als Reservoir. Infektionen des Menschen mit *B. miyamotoi* können zu einem unspezifischen Krankheitsbild mit wiederkehrendem Fieber, Kopf-, Gelenks- und Muskelschmerzen sowie Müdigkeit und Übelkeit führen. Meningoenzephalitiden wurden in komplizierten Fällen ebenfalls beobachtet. Die Behandlung erfolgt antibiotisch mit Doxycyclin oder auch Ceftriaxon bzw. Penicillin G (Krause et al. 2015, Siński et al. 2016).

2.2.2.4 Prävalenzen von Borrelien in wirtssuchenden *Dermacentor reticulatus*

Untersuchungen zu Prävalenzen von *Borrelia* spp. in wirtssuchenden *D. reticulatus* wurden in zahlreichen Studien durchgeführt und in der Mehrzahl der Fälle keine Infektionen mit diesen Bakterien festgestellt (Tab. 2). Jedoch wurden auch immer wieder positive Funde dokumentiert. Diese Studien zeigen Infektionsraten von 6-11,3 % in Deutschland (Kahl et al. 1992, Robert-Koch-Institut 2009), 0,09-1,6 % in Polen (Mierzejewska et al. 2015b, Zając et al. 2017), 1,5 % in Frankreich (Bonnet et al. 2013), 0,47 % in den Niederlanden (Nijhof et al. 2007) und 3,6 % in Westsibirien (Rar et al. 2005a). Bei Untersuchungen von kleineren Stichprobengrößen (n<50) wurde zudem von Borrelien-positiven Buntzecken in Polen, Großbritannien und Weißrussland berichtet (Hubbard et al. 1998, Biaduń et al. 2007, Reye et al. 2013, Król et al. 2015). Bestimmungen der Genospezies zeigten Infektionen mit Vertretern des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes, wobei *B. afzelii* dominierte (Tab. 2).

Literaturübersicht

Tab. 2: Prävalenzen von *Borrelia* spp. in wirtssuchenden *D. reticulatus*. Es wurden nur Studien mit einer Stichprobengröße von $n \geq 50$ berücksichtigt.

Land	Prävalenz	Genospezies	Referenz
Deutschland	0-11,3 %	<i>B. burg.</i>	Kahl et al. (1992); Robert-Koch-Institut (2009); Richter et al. (2012b); Obiegala et al. (2017)
Niederlande	0,47 %	<i>B. afz.</i> , <i>B. burg.</i>	Nijhof et al. (2007)
Großbritannien	0 %		Tijssse-Klasen et al. (2013)
Frankreich	1,5 %	<i>B. burg.</i> s.l.	Bonnet et al. (2013)
Spanien	0 %		Barandika et al. (2008)
Polen	0-1,6 %	<i>B. afz.</i>	Mierzejewska et al. (2015b); Opalińska et al. (2016); Zajac et al. (2017)
Tschechien/ Österreich	0 %		Hubálek et al. (1998); Hubálek et al. (2003b)
Kroatien	0 %		Dobec et al. (2009)
Bosnien-Hzg.	0 %		Hodžić et al. (2016)
Serbien	0 %		Tomanović et al. (2013)
Ukraine	0 %		Didyk et al. (2017)
Weißrussland	4,27 %	<i>B. afz.</i> , <i>B. burg.</i> s.s., <i>B. burg.</i> s.l., <i>B. val.</i>	Reye et al. (2013)
Russland	3,6 %	<i>B. gar.</i>	Rar et al. (2005a)

B. afz. = *B. afzelii*, *B. burg.* = *B. burgdorferi*, *B. gar.* = *B. garinii*, *B. val.* = *B. valaisiana*

2.2.3 Im Zusammenhang mit *Dermacentor reticulatus* beschriebene *Anaplasma* spp.

2.2.3.1 Systematik und Morphologie

Anaplasmen sind gramnegative, obligat intrazellulär lebende Bakterien mit kokkoider bis ellipsoider Gestalt (Dumler et al. 2001). Nach Aktualisierung der Systematik wird die Gattung *Anaplasma* zusammen mit den Gattungen *Ehrlichia*, *Neorickettsia* und *Wolbachia* der Familie der Anaplasmataceae und damit der Ordnung der Rickettsiales zugeordnet (Dumler et al. 2001). Zu den auch in Europa verbreiteten Vertretern gehören *Anaplasma platys*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma ovis*, *A. marginale* und *A. phagocytophilum* (Rar und Golovljova 2011), wobei *D. reticulatus* ausschließlich im Zusammenhang mit den beiden letztgenannten Spezies beschrieben wurde (Földvári et al. 2016). *Anaplasma marginale* ist seit der Erstbeschreibung unter dem heutigen Namen bekannt (Theiler 1910). Dagegen wurden nach einer systematischen Änderung die bis dato zur *Ehrlichia phagocytophila*-Gruppe gehörigen Spezies *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia*

phagocytophila und der Erreger der humanen granulozytären Ehrlichiose unter der Bezeichnung *A. phagocytophilum* zusammengefasst (Dumler et al. 2001). Beide Erreger werden in eine Vielzahl von Stämmen, die sich u. a. in ihrer Pathogenität, Vektor- und Wirtsspezifität sowie der geografischen Verbreitung unterscheiden, unterteilt (Stuen 2007, de la Fuente et al. 2010, Kocan et al. 2010). *Anaplasma phagocytophilum* erreicht eine Größe von 0,4-1,3 µm (Einzelbakterium) bzw. einen Durchmesser von 1,5-2,5 µm bei Ausbildung der Makrokolonien (Morulae). *Anaplasma marginale* zeichnet sich durch die marginale Lage der 0,3-1 µm im Durchmesser messenden Einschlusskörperchen aus, welche 4-8 Bakterien beherbergen (Kocan et al. 2010, Atif 2015).

2.2.3.2 Verbreitung und Entwicklungsweg (Vektoren, Wirte, Reservoir)

Als Hauptvektoren für den weltweit verbreiteten Erreger *A. phagocytophilum* werden *I. scapularis*, *I. pacificus* und *Ixodes spinipalpis* (USA) bzw. *I. ricinus* und *I. persulcatus* (Europa, Asien) angeführt (Atif 2015). *Anaplasma marginale* kommt ebenfalls weltweit vor, findet aber primär in (sub)tropischen Gebieten Verbreitung (Kocan et al. 2015). Außerhalb dieser Regionen liegen Beschreibungen u. a. aus Süd- und Osteuropa bis hin zur Schweiz vor (Zivkovic et al. 2007). Weltweit gelten über 20 Zeckenspezies als Überträger dieses Bakteriums, wobei in erster Linie Vertreter der Gattungen *Dermacentor* und *Rhipicephalus* genannt werden (Atif 2015, Kocan et al. 2015). Die intrastadiale Übertragung des Erregers auf den Wirt wurde für *D. reticulatus* experimentell belegt (Zivkovic et al. 2007).

Die biologische Übertragung der Erreger erfolgt mit dem Speichel der Zecken (Woldehiwet 2010, Aubry und Geale 2011). Die Transmission von *A. phagocytophilum* auf den Wirt beginnt ab einer Zeitdauer von 24-36 Stunden (Katavolos et al. 1998, des Vignes et al. 2001). *Anaplasma marginale* kann in Abhängigkeit vom Stamm auch mechanisch über kontaminierte Instrumente, Tabaniden und Mücken übertragen werden. Eine intrauterine Transmission auf das Ungeborene wurde für beide Erregerarten beschrieben (Aubry und Geale 2011, Henniger et al. 2013, Kocan et al. 2015).

Im Wirt zeigt *A. phagocytophilum* einen Tropismus zu Monozyten sowie zu eosinophilen und neutrophilen Granulozyten. *Anaplasma marginale* parasitiert hingegen in Erythrozyten (Kocan et al. 2010, Woldehiwet 2010). Eine Infektion von Gefäßendothelzellen wird ebenfalls für beide Spezies diskutiert (Herron et al. 2005, Carreño et al. 2007, Wamsley et al. 2011). Primäre Wirte von *A. phagocytophilum* sind dabei Wildwiederkäuer, Kleinnager (Mäuse, Ratten, etc.) und Insektivoren (Spitzmäuse, Igel), sodass dem Erreger ein natürlicher Zecken-Wiederkäuer-Nagetier-Zyklus zugesprochen wird. Weitere Funde stammen aber auch aus Wildschweinen, Füchsen, Bären, Waschbären, Vögeln und Reptilien. Unter den domestizierten Säugetieren gelang der Nachweis von *A. phagocytophilum* in Wiederkäuern,

Pferden, Eseln, Hunden und Katzen (Blanco und Oteo 2002, Stuen et al. 2013, Dugat et al. 2015). Der Mensch, welcher ebenfalls infiziert werden kann, und die Mehrzahl domestizierter Tiere gelten als Fehlwirte (Teglas und Foley 2006). Im Gegensatz zu *A. phagocytophilum* zeigt *A. marginale* eine Wirtsspezifität zu Wiederkäuern. Weltweit wurde der Erreger bislang in Rindern, Bisons und verschiedenen Hirscharten gefunden (Kocan et al. 2010).

Zwischen den Zecken werden die Erreger in erster Linie transstadial weitergegeben. Da in den Zecken keine Infektion der Ovarien stattfindet, erfolgt keine transovarielle Übertragung (Kocan et al. 2015). Eine Ausnahme bildet lediglich *Dermacentor albipictus* (Baldrige et al. 2009). Als Reservoir für *A. phagocytophilum* fungieren vermutlich wildlebende Wirbeltiere, wobei in Europa primär Cerviden (z. B. Rotwild), Kleinnager und Insektivoren in Erwägung gezogen werden (Stuen et al. 2013, Dugat et al. 2015). Untersuchungen zu möglichen Reservoiren von *A. marginale* im Tierreich entstammen zumeist den USA und können aufgrund der unterschiedlichen Wirtspräferenzen der Erregerstämme nicht ohne weiteres auf andere Länder übertragen werden. Vermutlich bilden Schwarzwedelhirsch, Bison und Maultierhirsch entsprechende Reservoire (Aubry und Geale 2011). Aufgrund persistierender Infektionen können jedoch auch Rinder diese Funktion übernehmen (Kieser et al. 1990). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass männliche Vektorzecken durch ihr intermittierendes Saugverhalten *Anaplasma marginale* intrastadial weitergeben, wodurch diese ebenfalls Reservoirfunktion übernehmen (Kocan et al. 2010).

2.2.3.3 Prävalenzen in wirtssuchenden *Dermacentor reticulatus*

Prävalenzuntersuchungen zu Anaplasmen in wirtssuchenden *D. reticulatus* wurden bereits in zahlreichen Studien in Europa und Asien durchgeführt (Tab. 3). In Deutschland wurden bislang keine Infektionen von *D. reticulatus* mit Anaplasmen dokumentiert. Dahingegen wurden Prävalenzen von 1,1-8 % in wirtssuchenden Buntzecken in Frankreich, Polen, Ungarn, Bosnien-Herzegowina, Serbien und Litauen beschrieben (Paulauskas et al. 2012, Bonnet et al. 2013, Tomanović et al. 2013, Szekeres et al. 2015, Hodžić et al. 2016, Zajac et al. 2017). Von einer ungewöhnlich hohen Prävalenz (25,36 %) wurde im Gebiet von Tschernobyl berichtet (Karbowski et al. 2014). Mit Ausnahme von Bonnet et al. (2013), welche eine Infektion mit *A. marginale* nachwies, entsprachen alle beschriebenen Funde *A. phagocytophilum*.

Literaturübersicht

Tab. 3: Prävalenzen von *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. und *Cand. Neoehrlichia mikurensis* in wirtssuchenden *D. reticulatus*. Es wurden nur Studien mit einer Stichprobe von $n \geq 50$ berücksichtigt.

Land	Prävalenz	Untersuchte Gattung			Referenz
		Ana.	Ehrl.	Neo.	
Deutschland	0 %	×		×	Richter et al. (2012b)
Niederlande/	0 %	×			Zivkovic et al. (2007); Jahfari et al. (2014)
Belgien	0 %	×		×	Jahfari et al. (2012)
	0 %	×	×	×	Nijhof et al. (2007)
Großbritannien	0 %	×		×	Tijssse-Klasen et al. (2013)
Frankreich	1,35 % ^{b)}	×			Bonnet et al. (2013)
Spanien	0 %	×			Barandika et al. (2008)
Österreich	0 %	×			Sixl et al. (2003)
	0 %	×	×	×	Duscher et al. (2016)
Polen	0-1,1 % ^{a)}	×			Opalińska et al. (2016); Zając et al. (2017)
Litauen	8 % ^{a)}	×			Paulauskas et al. (2012)
Serbien	1,89 % ^{a)}	×			Tomanović et al. (2013)
Bosnien-Hzg.	1,85 % ^{a)}	×		×	Hodžić et al. (2016)
Ungarn	0 %	×			Hornok et al. (2016)
	3,1 % ^{a)}	×		×	Szekeres et al. (2015)
Ukraine	0-25,36 % ^{a)}	×			Karbowiak et al. (2014); Didyk et al. (2017);
	0,01 % ^{a)}	×			Rogovskyy et al. (2018)
Weißrussland	0 %	×			Reye et al. (2013)
Russland	0 %	×	×		Rar et al. (2005a)
	0 %	×	×		Shpynov et al. (2006)
	0 %			×	Shpynov et al. (2004)

Ana. = *Anaplasma* spp., Ehrl. = *Ehrlichia* spp., Neo. = *Cand. Neoehrlichia mikurensis*;

^{a)} *A. phagocytophilum*; ^{b)} *A. marginale*

2.2.3.4 Krankheitsbilder infolge einer Anaplasmen-Infektion

Anaplasma phagocytophilum als Erreger der granulozytären Anaplasmosis

Anaplasma phagocytophilum trägt weltweit große Bedeutung als Erreger der granulozytären Anaplasmosis bei Hunden, Pferden und Menschen sowie als Auslöser des Weidefiebers (Tick Borne Fever) in domestizierten und wildlebenden Wiederkäuern (Dugat et al. 2015).

Das Weidefieber tritt ausschließlich in Europa auf und ist von großer wirtschaftlicher Bedeutung (Dugat et al. 2015). Klinisch zeigt sich die Erkrankung in erster Linie durch hohes

Fieber, Anorexie, respiratorischen Erscheinungen, Milchrückgang, Aborte und vereinzelte Todesfälle (Woldehiwet 2006).

Berichte der humanen granulozytären Anaplasiose entstammen vor allem den USA, aber auch europäischen Ländern wie Spanien, Schweden, Norwegen, Polen und Slowenien (Bjöersdorff et al. 1999, Oteo et al. 2000, Karlsson et al. 2001, Tylewska-Wierzbanowska et al. 2001, Lotric-Furlan et al. 2005). In Deutschland ist bislang kein klinischer Fall bekannt (von Wissmann et al. 2015). Durch Seroprävalenzen von 2 % bzw. von bis zu 14 % bei exponierten Personen wie z. B. Waldarbeitern wird jedoch der Kontakt zum Erreger auch in Deutschland deutlich (Fingerle et al. 1997, Hunfeld und Brade 1999, Kowalski et al. 2006). Die Symptome einer klinisch ausgeprägten Anaplasiose äußern sich durch Unwohlsein, Fieber, Myalgien und Kopfschmerzen. In seltenen Fällen treten zentralnervöse Beschwerden als Komplikation auf bzw. endet die Erkrankung tödlich (Thomas et al. 2009).

Die canine granulozytäre Anaplasiose verläuft überwiegend subklinisch (Carrade et al. 2009). In Deutschland wurden trotz der Seroprävalenzen von 19-50 % nur vereinzelte autochthone Erkrankungsfälle beschrieben (Jensen et al. 2007, Kohn et al. 2008, Kohn et al. 2011). Die Symptomatik ist unspezifisch und zeigt sich u. a. durch Lethargie, Fieber, Anorexie, Bewegungsunlust und Lahmheiten. In einigen Fällen wurde auch von Husten, Diarrhoe, Vomitus, blassen Schleimhäuten und einer Lymphadenopathie berichtet (Kohn et al. 2008, Sainz et al. 2015).

Im Blutbild zeigen sich bei allen aufgeführten Erkrankungen eine Thrombozytopenie, Leukopenie, Anämie und Veränderungen der Leberenzymwerte. Durch Schädigungen der weißen Blutzellen wird der Krankheitsverlauf häufig durch Sekundärinfektionen erschwert (Woldehiwet 2006, Carrade et al. 2009, Thomas et al. 2009).

Anaplasma marginale als Erreger der bovinen Anaplasiose

Klinisch zeigt sich die bovine Anaplasiose in Form von Fieber, Gewichtsverlust, Lethargie, Anämie, Ikterus, einer Tachykardie und Tachypnoe. Aufgrund der immunbedingten Phagozytose der infizierten Erythrozyten bleiben eine Hämoglobinämie und Hämoglobinurie aus. Große ökonomische Schäden entstehen letztlich durch eine verminderte Milchleistung bzw. Gewichtszunahme, Aborte, durch eine Infertilität bei Bullen und durch Todesfälle, welche bei bis zu 49 % der über zweijährigen Tiere eintreten (Kocan et al. 2003, Kocan et al. 2010, Aubry und Geale 2011). Es ist davon auszugehen, dass der Erreger trotz überstandener Erkrankung lebenslang im Rind persistiert und der Immunantwort durch Variationen in den MSP (major surface protein)-Genen entgeht (Kieser et al. 1990, Palmer et al. 2006). Obwohl klinische Fälle neben den endemischen (sub)tropischen Gebieten auch in der Schweiz, Österreich und Ungarn diagnostiziert wurden, liegen aus Deutschland bislang keine Berichte vor (Aubry und Geale 2011, Hornok et al. 2012).

2.2.3.5 Diagnose und Therapie der Krankheitsbilder

Innerhalb der ersten Woche post infectionem, der akuten Phase der Erkrankung, sind Makrokolonien beider Erreger in den spezifischen Zielzellen mittels Giemsa-Färbung im Blutaussstrich nachweisbar. Weitaus sensitiver und spezifischer arbeiten jedoch verschiedene PCR-Verfahren. In der Spätphase der Erkrankung, 2-4 Wochen nach der Infektion, werden serologische Untersuchungen zur Diagnostik herangezogen, wobei primär der IFAT und der ELISA Anwendung finden. Ein vierfacher Anstieg der Antikörperspiegel zwischen dem Akutserum und einer weiteren Serumprobe innerhalb von 2-4 Wochen spricht für ein aktuelles Infektionsgeschehen. Die serologischen Verfahren bergen jedoch die Gefahr möglicher Kreuzreaktionen zu anderen Vertretern der Anaplasmataceae (Aubry und Geale 2011, Atif 2015, Sainz et al. 2015, CDC 2016).

Zur Behandlung der humanen und caninen granulozytären Anaplasrose ist das Antibiotikum Doxycyclin das Mittel der Wahl. Als wirkungsvolle Alternative gilt die Anwendung von Rifampicin (Mensch, Hund) bzw. Levofloxacin (Hund) (Sainz et al. 2015, CDC 2016). Bei Rind und Pferd werden primär Oxytetracycline eingesetzt. Bei der Therapie der durch *A. marginale* ausgelösten bovinen Anaplasrose finden in erster Linie Oxytetracyclin bzw. Chlortetracyclin Anwendung. Alle derzeit zur Behandlung der bovinen Anaplasrose zugelassenen Arzneimittel bewirken eine Besserung der klinischen Erscheinungen, führen aber infolge einer unzureichenden Erregerelimination häufig zur Ausbildung persistent infizierter Tiere (Aubry und Geale 2011, Atif 2015). Präventivmaßnahmen in Form von Vakzinen stehen für *A. phagocytophilum* nicht zur Verfügung. Für *A. marginale* existiert zwar ein auf *A. centrale* basierender Impfstoff, jedoch kann durch die genetische Diversität von *A. marginale* kein 100%iger Schutz erzeugt werden (Kocan et al. 2015).

2.2.4 Die Gattung *Ehrlichia* mit dem Schwerpunkt *Ehrlichia canis*

Die Gattung *Ehrlichia* gehört, wie auch die Anaplasmen, zur Familie der Anaplasmataceae und damit zur Ordnung der Rickettsiales (Dumler et al. 2001). Die wesentlichen Spezies in der Gattung der Ehrlichien sind *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia ruminantium*, *Ehrlichia canis* und *Ehrlichia muris* (Rar und Golovljova 2011), wobei durch Neubeschreibungen (z. B. *Ehrlichia minasensis*) die Gruppe schrittweise erweitert wird (Cabezas-Cruz et al. 2016). In Europa sind lediglich *E. muris* und *E. canis* vertreten. *Ehrlichia canis* wird aufgrund seiner Bedeutung als Infektionserreger beim Hund (Rar und Golovljova 2011) im Folgenden näher beleuchtet.

Ehrlichia canis ist ein gramnegatives, pleomorphes, obligat intrazelluläres Bakterium mit kokkoider Gestalt (Waner und Harrus 2000). Es verzeichnet eine Größe von 0,3-0,6 µm

(Kern- und retikuläre Form) bzw. 2-4 µm (Morulae) (Popov et al. 1998). *Ehrlichia canis* wird mit dem Speichel durch *Rhipicephalus sanguineus* übertragen (Fourie et al. 2013), wobei Gray et al. (2013) Fehler in der bisherigen Identifikation der Zecke vermuten und so Unklarheiten bezüglich der alleinigen Vektorrolle bestehen. *Rhipicephalus sanguineus* besiedelt überwiegend tropische bis mediterrane, aber auch gemäßigte Gebiete, wobei sie vor allem an das Leben in geschützten Zwingern und Innenräumen in sub(urbanen) Gebieten angepasst ist. Sämtliche Stadien dieser Schildzeckenart parasitieren in erster Linie am Hund (Dantas-Torres 2010, Gray et al. 2013). Eine Übertragung des Erregers erfolgt schon innerhalb der ersten 3-8 Stunden der Blutaufnahme (Fourie et al. 2013). Neben *R. sanguineus* wurde auch für *Dermacentor variabilis* die Fähigkeit zur Transmission von *E. canis* experimentell belegt (Johnson et al. 1998). *Dermacentor reticulatus* wird derzeit nicht als Vektor in Betracht gezogen. Auch spielen Prävalenzuntersuchungen bislang eine untergeordnete Rolle. Die in Tab. 3 aufgeführten Studien verdeutlichen das fehlende Vorkommen von *E. canis* und anderer Vertreter dieser Gattung in wirtssuchenden *D. reticulatus*.

Nachweise von *E. canis* entstammen zum überwiegenden Teil Studien zur serologischen Untersuchung von Hunden und zeigen, dass der Erreger in Asien, Afrika, Amerika und Europa vertreten ist. Der Großteil der Funde geht dabei aus (sub)tropischen Regionen hervor (Stich et al. 2008, Fourie et al. 2013). Die Prävalenzen zeigen eine große Spannweite und erreichen in Europa Werte bis 50 % (Sainz et al. 2015).

In Vertebraten infiziert *E. canis* Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten (Mylonakis et al. 2003, Rar und Golovljova 2011). Zwischen männlichen *R. sanguineus* ist die intrastadiale Weitergabe von *E. canis* während der Blutmahlzeit möglich (Bremer et al. 2005). Hauptsächlich wird der Erreger jedoch transstadial übertragen. Eine transovariable Weitergabe findet hingegen nicht statt (Groves et al. 1975, Smith et al. 1976). Reservoirfunktion übernehmen hingegen Wildkaniden (Rar und Golovljova 2011). Aufgrund einer subklinischen Phase im Krankheitsverlauf und einer möglichen Persistenz des Erregers trotz medikamentöser Behandlung wird zudem der Hund als Reservoir angeführt (Harrus et al. 1998, Waner und Harrus 2000).

Ehrlichia canis ist als Auslöser der caninen monozytären Ehrlichiose beim Hund von veterinärmedizinischer Bedeutung. In Deutschland gilt diese Multisystemerkrankung ausschließlich als Reiseerkrankung (Liebisch et al. 2006). Die anfängliche akute Phase geht mit Symptomen wie Lethargie, Anorexie, Fieber, Epistaxis, petechialen Blutungen und Ekchymosen einher. Es kommt zur Herausbildung einer milden Glomerulopathie sowie einer Spleno-, Hepato- und Lymphadenomegalie. Neurologische Veränderungen können sich infolge von Meningitiden einstellen. Zudem werden häufig ophthalmologische Veränderungen (Uveitiden, Korneaulzerationen, Glaukome, etc.) diagnostiziert. 2-4 Wochen

post infectionem kann die Infektion in eine über Monate bis Jahre andauernde subklinische Phase übergehen. Abschließend ist der Eintritt in das chronische Stadium möglich, welches durch eine Panzytopenie infolge einer Knochenmarksaplasie gekennzeichnet ist. Das klinische Bild ähnelt zunächst den Symptomen der akuten Phase. Häufig wird jedoch von schweren bis lebensbedrohlichen Komplikationen infolge von Superinfektionen mit anderen Erregern berichtet (Skotarczak 2003, Waner und Harrus 2013, Sainz et al. 2015). Im Labor tritt in Abhängigkeit von der Krankheitsphase eine Thrombozytopenie, Leukopenie und Anämie auf (Harrus et al. 1999).

Der traditionelle Nachweis von Morulae im akuten Stadium im Giemsa-gefärbten Blut- oder Lymphknotenmaterial (Mylonakis et al. 2003) hat eine vergleichsweise geringe Sensitivität (Sainz et al. 2015). In Bezug auf den serologischen Nachweis gilt der IFAT zur Detektion von Immunglobulin G-Antikörper als Goldstandard. Ein vierfacher Anstieg des Antikörper-Titers innerhalb von 7-14 Tagen deutet auf ein aktuelles Infektionsgeschehen hin (Harrus und Waner 2011). Darüber hinaus finden verschiedene ELISA-Systeme Anwendung (Harrus et al. 2002). Durch den direkten Erregernachweis mittels verschiedener PCR-Verfahren können evtl. vorhandene Kreuzreaktionen zu anderen Vertretern der Anaplasmataceae ausgeschlossen werden (Sainz et al. 2015).

Zur Therapie wird als Mittel der Wahl das Tetrazyklin Doxycyclin eingesetzt (Sainz et al. 2015). Verschiedene Studien können jedoch eine 100%ige Erregerelimination nicht immer bestätigen (Harrus et al. 1998, Harrus et al. 2004, Eddlestone et al. 2007, McClure et al. 2010). Als Alternative gilt das Antibiotikum Rifampicin. Jedoch wurde auch hier eine Erregerpersistenz trotz medikamentöser Behandlung beobachtet (Schaefer et al. 2008, Theodorou et al. 2013). Eine Prävention durch Impfstoffe ist derzeit nicht möglich (Sainz et al. 2015). Experimentelle Studien mit einem attenuierten Stamm von *E. canis* lassen jedoch erste Erfolge erkennen (Rudoler et al. 2012).

2.2.5 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*

Die im Folgenden näher beschriebene Spezies *Cand. Neoehrlichia mikurensis* bildet zusammen mit *Candidatus Neoehrlichia lotoris* die Gattung *Candidatus Neoehrlichia*, welche relativ neu auch der Familie der Anaplasmataceae zugeordnet wird (Kawahara et al. 2004, Silaghi et al. 2016). Das Cluster *Cand. Neoehrlichia mikurensis* beinhaltet verschiedene Stämme, welche auch die bis dato häufig beschriebenen Funde von *Candidatus Ehrlichia walkerii*, *Ehrlichia*-like bacteria „Schotti-Variant“ bzw. *Ehrlichia*-like Rattus strain umfassen (Brouqui et al. 2003, Kawahara et al. 2004).

Bisherige Untersuchungen verdeutlichen eine Verbreitung von *Cand. Neoehrlichia mikurensis* in weiten Teilen Europas und Asiens (Rar und Golovljova 2011,

Silaghi et al. 2016). Bei dem Erreger handelt es sich um ein gramnegatives, pleomorphes α -Proteobakterium, welches eine Größe von 0,5-1,2 μm erreicht und einen Tropismus zu endothelialen Zellen aufzuweisen scheint (Kawahara et al. 2004). Darüber hinaus wurde *Cand. Neoehrlichia mikurensis* in Granulozyten menschlicher Blutproben detektiert (Pekova et al. 2011). Beschreibungen zum Entwicklungszyklus dieses Bakteriums liegen bislang kaum vor. Das Potential zur Erregertransmission wurde bis dato in keiner der detektierten Trägerzecken experimentell untersucht. *Ixodes ricinus* und *I. persulcatus* werden jedoch als wichtige Vektoren diskutiert (Rar und Golovljova 2011). Untersuchungen zur Bedeutung von *D. reticulatus* im Zusammenhang mit *Cand. Neoehrlichia mikurensis* liegen kaum vor. Bisherige Studien zur Prävalenz des Erregers in wirtssuchenden Buntzecken sind in Tab. 3 aufgelistet. Sie zeigen, dass dieses Pathogen bislang nicht nachgewiesen wurde. Der einzige beschriebene Fund einer infizierten wirtssuchenden Buntzecke geht aus der parallel zu dieser Untersuchung durchgeführten Studie im Havelland (Brandenburg) hervor, in der eine Stichprobe von 97 Buntzecken untersucht wurde (Krücken et al. 2013).

Zwischen den Zecken wird der Erreger vermutlich transstadial weitergegeben (Jahfari et al. 2012). Eine transovarielle Übertragung findet hingegen vermutlich nicht statt. Das Reservoir für das Bakterium bilden möglicherweise Kleinnager (Burri et al. 2014). Die Übertragung von *Cand. Neoehrlichia mikurensis* auf den Wirt erfolgt vermutlich, ähnlich wie bei *A. phagocytophilum* oder den Lyme-Spirochäten, nicht sofort mit Saugbeginn (Richter und Matuschka 2012a). Nachweise des Erregers liegen bislang im Menschen, Braunbär, Dachs, Mufflon, Igel, Vogel, in der Gämse, seltener auch im Hund, vor allem aber in kleinen Nagetieren vor (Rar und Golovljova 2011, Liesner et al. 2016, Silaghi et al. 2016).

Klinische Erscheinungen infolge einer *Cand. Neoehrlichia mikurensis*-Infektion wurden in geringer Fallzahl bei Menschen und Hunden beschrieben, wobei die Erkrankung mit aller Wahrscheinlichkeit als unterdiagnostiziert gilt (Hofmann-Lehmann et al. 2016). Der bisher einzige gesicherte diagnostizierte Fall einer klinischen caninen Neoehrlichiose stammt von einem immunsupprimierten Hund aus dem süddeutschen Raum. Das Tier wurde durch sein lethargisches Verhalten und durch subkutane Hämorrhagien auffällig. Im Blutbild konnte neben einer Thrombozytopenie eine milde Anämie festgestellt werden (Diniz et al. 2011). Beim Menschen wurden klinisch ausgeprägte Infektionen bei zuvor gesunden Patienten bislang nur in einem letal verlaufenden Fall in Deutschland und bei mehreren mild verlaufenden Fällen in China beschrieben (von Loewenich et al. 2010, Li et al. 2012). Ansonsten stammen Berichte klinisch manifester Infektionen ausschließlich von immunsupprimierten Patienten aus Schweden, Tschechien, Deutschland und der Schweiz. Die Klinik äußert sich durch Fieber, Kopf-, Gelenks- und Muskelschmerzen. Teilweise treten pulmonale Erscheinungen auf. Zudem wurden Erytheme, subkutane Hämorrhagien, Aneurysmen und Thrombosen beschrieben. Im Blutbild zeigt sich häufig eine

Thrombozytopenie, Anämie, Leukozytose und ein Anstieg des C-reaktiven Proteins (Fehr et al. 2010, von Loewenich et al. 2010, Welinder-Olsson et al. 2010, Pekova et al. 2011, Richter und Matuschka 2012a, Maurer et al. 2013, Grankvist et al. 2014, Andréasson et al. 2015).

Methoden zum Nachweis von *Cand. Neoehrlichia mikurensis* beruhen derzeit auf der Detektion von Erreger-DNA in Blutproben mittels PCR. Die Etablierung eines serologischen Nachweisverfahrens zur Identifizierung spezifischer *Cand. Neoehrlichia mikurensis* Antikörper ist bislang nicht beschrieben. Ebenso ist die Möglichkeit zur Anzucht des Erregers in Routinemedien nicht gegeben. Die Behandlung einer diagnostizierten *Cand. Neoehrlichia mikurensis*-Infektion bei Mensch und Hund erfolgt mit dem Antibiotikum Doxycyclin (Rar und Golovljova 2011, Moniuszko et al. 2015).

2.2.6 Im Zusammenhang mit *Dermacentor reticulatus* beschriebene *Rickettsia* spp.

2.2.6.1 Systematik und Morphologie

Rickettsien sind gramnegative, obligat intrazellulär lebende Bakterien, die ein stäbchenförmiges Erscheinungsbild und eine Größe von $0,3-0,45 \mu\text{m} \times 0,8-1,2 \mu\text{m}$ aufweisen (Karbowski et al. 2016a). Durch die Aktualisierung der Systematik wurde die Gattung *Rickettsia* zusammen mit der Gattung *Orientia* der Familie der Rickettsiaceae zugeordnet, welche zusammen mit der Familie der Anaplasmataceae wiederum die Ordnung der Rickettsiales bildet (Dumler et al. 2001). Die Gattung unterliegt fortlaufenden Neuordnungen. Auf Grundlage einer Phylogenomanalyse ganzer Genomsequenzen erfolgt die Einteilung aktuell in sieben Gruppen. Darunter befinden sich u. a. die spotted fever group, typhus group, *Rickettsia bellii* group, *Rickettsia canadensis* group, transitional group und die *R. helvetica* group (Murray et al. 2016). *Rickettsia raoultii*, welche ebenfalls der spotted fever group zugeordnet wird (Merhej und Raoult 2011), wird immer wieder im Zusammenhang mit *D. reticulatus* beschrieben. Mediannikov et al. (2008) belegen, dass die bis dato als *Rickettsia* sp. Genospezies DnS14, DnS28 und RpA4 gehandelten Rickettsien als Stämme von *R. raoultii* eingeordnet werden können.

2.2.6.2 Verbreitung und Entwicklungsweg (Vektoren, Wirte, Reservoir)

Als Vektoren der spotted fever group fungieren überwiegend Zecken, aber auch Milben und Flöhe spielen für wenige Arten eine wichtige Rolle. Vertreter der spotted fever group sind weltweit verbreitet und umfassen über 25 Genospezies (Parola et al. 2013, Karbowski et al. 2016a). Zu den auch in Europa verbreiteten Genospezies mit bereits nachgewiesener Pathogenität gehören die verschiedenen Subspezies von *Rickettsia conorii* und *Rickettsia*

Literaturübersicht

sibirica sowie *Rickettsia monacensis*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia aeschlimannii*, *R. slovacica*, *R. helvetica* und *R. raoultii*, wobei die sechs letztgenannten Vertreter auch in Deutschland vorkommen (Parola et al. 2013). In *D. reticulatus* wurden bislang generell *R. raoultii*, *R. slovacica*, *R. helvetica* und *R. sibirica sibirica* detektiert (Földvári et al. 2016, Rubel et al. 2016).

Rickettsia raoultii und *R. slovacica* sind in Europa, Asien und Nordafrika verbreitet und werden durch *D. reticulatus* und *D. marginatus* übertragen (Parola et al. 2013). Experimentell konnte eine Vektorfunktion für *R. raoultii* zudem für *Dermacentor nutalli* und *Dermacentor silvarum* belegt werden (Samoylenko et al. 2009). Für *R. helvetica* liegen bislang keine Hinweise zu einer möglichen Vektorkompetenz von *D. reticulatus* vor (Földvári et al. 2016). Als Hauptvektor gilt *I. ricinus*. Der Erreger wurde in mindestens 24 europäischen Ländern, in Asien und Nordafrika in Zecken nachgewiesen. Für *R. sibirica sibirica* gilt *D. reticulatus* nach bisherigem Kenntnisstand ebenfalls nur als Träger. Da der Erreger zudem nur in Asien beheimatet ist (Parola et al. 2013), wird auf weitere Erläuterungen zu dieser Rickettsie verzichtet.

Die Übertragung der spotted fever group-Rickettsien auf den Wirt erfolgt typischerweise über den Speichel der Vektorzecken. Für *R. raoultii* ist zudem die Transmission durch männliche Zecken der Spezies *D. reticulatus* und *D. marginatus* belegt (Földvári et al. 2013). Durch den Nachweis von *R. slovacica* im Zeckenkot kann jedoch eine horizontale Übertragung nicht ausgeschlossen werden (Parola et al. 2005). Der Übertragungsbeginn von Rickettsien durch die Vektorzecken wird ab einem Zeitraum von 24 Stunden nach Saugbeginn angegeben (Thorner et al. 1998). In experimentellen Untersuchungen wurde *Rickettsia rickettsii* jedoch schon nach 10 Stunden Saugdauer zuverlässig durch *Dermacentor andersoni* auf Meerschweinchen übertragen. Aber auch Transmissionszeiten von weniger als 2 Stunden wurden in dieser Studie z. T. beobachtet (Ricketts 1991). Spotted fever group-Rickettsien infizieren in den Wirten eine Vielzahl kernhaltiger Zellen, insbesondere aber Endothelzellen (Walker et al. 2007).

Für alle in *D. reticulatus* beschriebenen Genospezies gilt der Mensch als Wirt (Kapitel 2.2.6.4). Funde von *R. raoultii* stammen ansonsten, mit Ausnahme vereinzelter Nachweise in Hunden und Rötelmäusen (*M. glareolus*) (Liesner et al. 2016, Obiegala et al. 2017), fast ausschließlich aus Zecken. *Rickettsia slovacica* wurde zudem serologisch in Hunden, domestizierten Wiederkäuern und Wildschweinen nachgewiesen (Kováčová et al. 2006, Ortuño et al. 2007, Ortuño et al. 2012). Eine experimentelle Infektion verschiedener Wildnagetierarten gibt Hinweise auf eine Empfänglichkeit für *R. slovacica* (Řeháček et al. 1992). Dahingegen wurde *R. helvetica* in einer Vielzahl von Wirten wie Wildmäusen, Igel, Vögeln, Cerviden, Waschbären und Wildschweinen nachgewiesen (Inokuma et al. 2008,

Sprong et al. 2009, Sashika et al. 2010, Schex et al. 2011, Speck et al. 2013, Berthová et al. 2016).

Eine mögliche Reservoirfunktion ausgehend von diesen Wirten ist derzeit ungeklärt (Karbowski et al. 2016a). Unter den europäischen Rickettsienspezies wurde experimentell ausschließlich die Übertragung von *R. conorii* durch den infizierten Wirt belegt (Levin et al. 2012). Wildschweine und Mäuseartige werden jedoch als Reservoir für *R. slovaca* vermutet (Karbowski et al. 2016a). Eine diskutierte Reservoirfähigkeit von Cerviden für *R. helvetica* wird durch Overzier et al. (2013) angefochten, da die Wirte trotz der natürlichen Infestation mit *R. helvetica*-positiven Zecken in der PCR-Untersuchung negativ blieben. Sicher ist hingegen die Reservoirfunktion durch die Vektorzecken selbst, da sie neben der transstadialen Übertragung und einer möglichen Weitergabe der Erreger über das Co-feeding auch zur transovariellen Übertragung fähig sind (Parola et al. 2005, Karbowski et al. 2016a). *Dermacentor reticulatus* übernimmt ausschließlich für *R. raoultii* und *R. slovaca* Reservoirfunktion (Samoylenko et al. 2009, Alberdi et al. 2012).

2.2.6.3 Rickettsien-Prävalenzen in wirtssuchenden *Dermacentor reticulatus*

Untersuchungen zu Rickettsien-Infektionen in wirtssuchenden *D. reticulatus* wurden in zahlreichen Studien in Europa und Asien durchgeführt und sind in Tab. 4 aufgeführt. Es ist ersichtlich, dass in nahezu allen Untersuchungen Rickettsien nachgewiesen wurden. Ausschließlich in Serbien und Kroatien wurden keine Rickettsien detektiert (Radulović et al. 2011, Radzijeuskaja et al. 2015). In den verbleibenden Studien zeigen sich auffällig große Variabilitäten in den Prävalenzen, welche von minimal 4 % in Lettland (Radzijeuskaja et al. 2015) bis maximal 72,6 % in der Ukraine (Karbowski et al. 2016b) reichen. Auch in Deutschland wurden hohe Anteile infizierter *D. reticulatus* (33,1-70,5 %) dokumentiert. Studien in denen eine Sequenzierung positiver Proben vorgenommen wurde, verdeutlichen die Dominanz von *R. raoultii*. Darüber hinaus wurden Funde von *R. helvetica* bzw. *R. slovaca* in geringer Anzahl beschrieben (Tab. 4).

Literaturübersicht

Tab. 4: Prävalenzen von *Rickettsia* spp. in wirtssuchenden *D. reticulatus*. Es wurden nur Studien mit einer Stichprobengröße von $n \geq 50$ berücksichtigt.

Land	Prävalenz	Genospezies	Referenz
Deutschland	33,1-70,5 %	<i>R. r.</i>	Robert-Koch-Institut (2009); Pluta et al. (2010); Rumer et al. (2011); Silaghi et al. (2011); Obiegala et al. (2017)
Großbritannien	5-28,8 %	<i>R. r.</i> , <i>R. h.</i>	Tijssse-Klasen et al. (2011); Tijssse-Klasen et al. (2013)
Niederlande	6-15,3 %	<i>R. r.</i>	Nijhof et al. (2007); Hofmeester et al. (2016)
Spanien	49,5 %	<i>R. r.</i>	Barandika et al. (2008)
Österreich	65 %	<i>R. r.</i>	Duscher et al. (2016)
Litauen/Lettland	4-4,9 %	<i>R. r.</i>	Radzijeuskaja et al. (2015)
Polen	15,8-56,7 %	<i>R. r.</i> , <i>R. sp.</i>	Stańczak (2006); Chmielewski et al. (2009); Wójcik-Fatla et al. (2013); Stańczak et al. (2018); Mierzejewska et al. (2015b); Radzijeuskaja et al. (2015); Stańczak et al. (2016); Zając et al. (2017)
Tschechien	18,08 %	<i>R. r.</i> , <i>R. h.</i>	Rudolf et al. (2016)
Kroatien	0-12 %	<i>R. s.</i> , <i>R. h.</i>	Dobec et al. (2009); Radzijeuskaja et al. (2015)
Slowakei	10,8-50,3 %	<i>R. r.</i> , <i>R. s.</i> , <i>R. h.</i>	Špitalská et al. (2012); Svehlová et al. (2014); Radzijeuskaja et al. (2015); Špitalská et al. (2018)
Serbien	0 %		Radulović et al. (2011)
Bosnien-Hzg.	18,5 %	<i>R. r.</i> , <i>R. s.</i>	Hodžić et al. (2016)
Ungarn	34,4-57,8 %	<i>R. r.</i> , <i>R. h.</i>	Szekeres et al. (2016); Hornok et al. (2017)
Ukraine	10,1-72,6 %	<i>R. r.</i>	Karbowiak et al. (2016b); Rogovskyy et al. (2018); Didyk et al. (2017)
Weißrussland	44,5 %	<i>R. r.</i> , <i>R. sp.</i>	Reye et al. (2013)
Russland/ Kasachstan	36,3-50 %	<i>R. r.</i>	Shpynov et al. (2004); Shpynov et al. (2006)

R. s. = *R. slovaca*, *R. h.* = *R. helvetica*, *R. sp.* = *Rickettsia* sp., *R. r.* = *R. raoultii* (z. T. in der Literatur noch als *R. RpA4* angegeben)

2.2.6.4 Krankheitsbilder infolge einer Rickettsien-Infektion, Diagnostik und Therapie

Krankheitsbilder

Alle im Zusammenhang mit *D. reticulatus* beschriebenen Rickettsien, aber auch alle anderen in Deutschland vorkommenden Vertreter der spotted fever group, sind grundsätzlich humanpathogen (Parola et al. 2013). Ausgehend von diesen Erregern wurden in der

Veterinärmedizin hingegen keine Erkrankungsfälle publiziert. Die wenigen serologischen bzw. molekularbiologischen Nachweise von *R. raoultii*, *R. slovaca* und *R. helvetica* stammen ausschließlich aus asymptomatischen Hunden (Kováčová et al. 2006, Elfving et al. 2015, Wächter et al. 2015, Liesner et al. 2016).

In der Humanmedizin gelten sowohl *R. slovaca* als auch *R. raoultii* als Auslöser der SENLAT (scalp eschar and neck lymph adenopathy after tick bite), veraltet TIBOLA (Tick-borne lymphadenopathy) (Parola et al. 2013). Klinische Fälle entstammen ausschließlich Europa, wobei in erster Linie Spanien, Frankreich und Ungarn betroffen sind (Silva-Pinto et al. 2014). In Deutschland wurde die SENLAT in Rheinland-Pfalz und im Gebiet von Freiburg beschrieben (Pluta et al. 2009, Rieg et al. 2011). Entsprechend der Aktivität der beiden Vektorzecken *D. marginatus* und *D. reticulatus* werden Erkrankungsfälle gehäuft im Frühjahr und Herbst gemeldet. Charakteristische Anhaltspunkte der Erkrankung sind ein meist am Kopf befindlicher, mit einer ausgeprägten Schorfbildung einhergehender Zeckenstich und eine Lymphadenopathie. Darüber hinaus werden Gesichtssödeme, Kopfschmerzen, Asthenien, z. T. Alopezien an den Stichstellen und seltener Fieber und Ausschlag beschrieben. Laborbefunde sind unspezifisch (Parola et al. 2009, Silva-Pinto et al. 2014).

Rickettsia helvetica, wofür *D. reticulatus* bislang nur als Träger gilt, führt zu einem klinisch stark variierenden Bild und zeigt sich durch fieberhafte Erkrankungen mit und ohne Bildung von Ausschlag, Muskelschwäche und Kopfschmerz (Fournier et al. 2004, Nilsson 2009). Fälle einer subakuten Meningitis und einer letal verlaufenden Perimyokarditis werden ebenfalls mit diesem Erreger in Verbindung gebracht (Nilsson et al. 1999, Nilsson et al. 2010). Serologisch bzw. molekularbiologisch bestätigte Krankheitsfälle wurden in der Schweiz, Slowakei, Österreich, Frankreich, Italien und Dänemark beschrieben (Parola et al. 2013).

Diagnose und Behandlung der Rickettsiosen

In der Humanmedizin wird die klinische Verdachtsdiagnose in erster Linie mithilfe der Serologie (ELISA, IFAT, Mikro-Immunfluoreszenztest) abgesichert. Ein vierfacher Antikörperanstieg zwischen den im Abstand von zwei Wochen genommenen Blutproben bestätigt eine aktuelle Infektion. Aufgrund häufig vorhandener Kreuzreaktionen sollten zur Bestimmung der Rickettsienspezies ein Western-Blot bzw. eine molekularbiologische Untersuchung per PCR angeschlossen werden. Die quantitative real-time PCR aus Tupferproben von Hautläsionen gilt bei Letzterem als Mittel der Wahl (Parola et al. 2005, Parola et al. 2013).

Die Behandlung erfolgt in erster Linie mit dem Antibiotikum Doxycyclin. Als Alternative stehen zudem Makrolide, wie z. B. Josamycin und Azithromycin, zur Verfügung (Silva-Pinto et al. 2014). Eine Prävention durch Vakzine ist derzeit nicht möglich (McBride et al. 2010).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Enzyme, Reagenzien und Mikroorganismen

Bezugsquelle	Material
BIOSCIENCE, Jena, Dtl.	Eva Green Fluorescent DNA Stain
BODE CHEMIE, Hamburg, Dtl.	Bacillol plus
FERMENTAS, St. Leon-Rot, Dtl.	Gene Ruler DNA Ladder (50 bp, 100 bp, 1 kb); Glycogen RNA Grade; Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker; 10 × Puffer EcoRI mit BSA; EcoRI 10 U/μl Restriktionsenzym; Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase; 10 × Hot Start PCR Puffer; 25 mM MgCl ₂ ; dNTP Mix (10 mM each); MaximaProbe qPCR Master Mix (2 ×)
FINNZYME, VANTAA, Finnland	Phusion Hot Start II Polymerase; 5 × Phusion HF Puffer
HONEYWELL SPECIALITY CHEMICALS, Seelze, Dtl.	Essigsäure, 100 %
INVITROGEN, Karlsruhe, Dtl.	One Shot TOP10 Zellen chemisch kompetente <i>E. coli</i> Zellen (F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80/ <i>lac</i> ZΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>araleu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> (Transformationseffizienz >1 × 10 ⁹)); Oligonukleotide
LABGENE SCIENTIFIC SA, Chatel-St-Denis, Schweiz	GRGreen (GRSafe) Nucleic Acid Gel Stain
LYSOFORM, Berlin, Dtl.	Händedesinfektionsmittel AHD 2000
ROTH, Karlsruhe, Dtl.	Agarose NEEO Ultra Qualität Roti-garose; Bromphenolblau; Carbenicillin Dinatriumsalz >90 % für die Biochemie; DEPC-behandeltes Wasser, Bioscience-Grade, Nuklease frei und autoklaviert; di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄); EDTA Dinatriumsalz Dihydrat; Ethanol 99,8 % DAB reinst; Glycerin ROTIPURAN ≥ 99,5 %; Kaliumchlorid (KCl); Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄); Kanamycinsulfat; LB (lysogeny broth)-Agar; LB-Medium; Natriumacetat ≥ 98,5 %, reinst, wasserfrei; Natriumchlorid (NaCl); Natriumhydroxid Plätzchen; 2-Propanol ROTISOLV ≥ 99,95 %; Roti-Nukleinsäurefrei; Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-acetat PUFFERAN ≥ 99 %

Material und Methoden

3.1.2 Herstellung von Medien, Puffern und Lösungen

Name	Verwendete Reagenzien
LB-Medium (lysogeny broth-Medium)	25 g mit Aqua bidest auf 1 l auffüllen, autoklavieren und vor Gebrauch mit Antibiotikum (Kanamycin oder Carbenicillin, Endkonzentration 50 µl/ml) versetzen
LB-Agar (lysogeny broth-Agar)	15 g LB-Agar in 1 l LB-Medium anrühren und autoklavieren, vor Gebrauch mit Antibiotikum (Kanamycin oder Carbenicillin 50 µl/ml) versetzen
Agarosegele 0,8 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %	0,8 %, 1 %, 1,5 %, 2 % Agarose in 1 × TAE-Puffer aufkochen; Lagerung im Wasserbad bei 65 °C
DEPC-Ethanol 75 %	75 % Ethanol in DEPC-Wasser
EDTA-Lösung	18,61 g EDTA mit Aqua bidest auf 80 ml auffüllen, pH mit konzentrierter HCl und NaOH-Plätzchen auf 8,0 einstellen, ad 100 ml Aqua bidest
Ladungspuffer für Agarosegele (6 × Loading Dye)	1 mM TrisHCl (pH 7,6), 6 ml Bromphenolblaulösung (0,5 %), 60 ml Glycerol (100 %), 12 ml EDTA (500 mM) ad 100 ml Aqua bidest. Verdünnung vor Benutzung um 1:6
PBS-Puffer (phosphatgepufferte Salzlösung)	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na ₂ HPO ₄ , 0,24 g KH ₂ PO ₄ in Aqua bidest lösen und auf einen pH von 7,2 einstellen
50 × TAE-Puffer	2 M Tris, 5,71 % Eisessig und 50 mM EDTA (pH 8,0) in Aqua bidest
1 × TAE-Puffer	TAE-Puffer 1:50 verdünnt mit Aqua bidest
Bromphenolblaulösung (0,5 %)	1 g Bromphenolblau in 200 ml Aqua bidest lösen
Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 6)	24,61 g Natriumacetat reinst, Einstellung des pH-Wertes mit Essigsäure, ad 100 ml Aqua bidest, 0,1 ml DEPC hinzufügen und autoklavieren

3.1.3 Kits

Bezugsquelle	Reaktionskit
INVITROGEN, Karlsruhe, Dtl.	TOPO TA Cloning Kit for Sequencing; TOPO TA Cloning Vektor PCR 4 TOPO; Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit; pCR 4Blunt-TOPO Vektor
MACHEREY-NAGEL, Düren, Dtl.	NucleoSpin Plasmid; NucleoSpin Blood; NucleoSpin 8 Blood; NucleoSpin 96 Blood
PROMEGA, Madison, USA	PureYield Plasmid Midiprep System; Maxwell 16 LEV Blood DNA Kit
ROCHE Deutschland GmbH, Mannheim, Dtl.	High Pure PCR Product Purification Kit

Material und Methoden

3.1.4 Software

Software	Bezugsquelle
Adobe Illustrator	Adobe Systems Software Ireland Limited
Biorad CFX Manager 2.0	BIORAD, München, Dtl.
BLAST	Altschul et al. (1990), National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
Clone Manager Professional 9	Scientific & Educational Software, Cary, USA
Corel DRAW Graphic Suites X5	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
End Note X7	Thomson Reuters, San Francisco, USA
Gen5	BIOTEK Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Dtl.
Gene Snap 7.09.06	Syngene, Cambridge, UK
Mega 7	Kumar et al. (2016), http://www.megasoftware.net/
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA
Precision Melt Analysis Software	BIORAD, München, Dtl.
RStatistics	The R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich; www.r-project.org ; Version 3.3.2
RStudio	RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA; http://www.rstudio.com/ Version 0.99.903
Sigma Plot	Systat Software, Chicago, USA

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Bezugsquelle	Verbrauchsmaterial
BIOZYM, Hessisch-Oldendorf, Dtl.	Filtertips (10 µl, 100 µl, 1000 µl); PCR-Gefäße: 0,2 ml Soft Tubes, Single Cap 8er-Soft Strips 0,2 ml, PCR 96-Well TW-MT Platte (weiß)
DUNN, Asbach, Dtl.	Homogenisationspistille
NERBE PLUS, Winsen/Luhe, Dtl.	Filtertips (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
ROTH, Karlsruhe, Dtl.	Handschuhe Rotiprotect-Latex; Nitrilhandschuhe; KIMTECH Mehrfachwischtücher; Rotizell Tissue-Tücher; Wägeschälchen; Rotibo-Skalpell-Klingen; Autoklavierband; Chemikalienlöffel; Parafilm M
SARSTEDT, Nümbrecht-Rommelsdorf, Dtl.	Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl); Petrischalen (ø 9 cm); Safe Seal Gefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml); Falcon (15 ml, 50 ml)

Material und Methoden

3.1.6 Technische Geräte

Bezugsquelle	Gerät
ANALYTIK JENA, Jena, Dtl.	Thermomixer TMix
BIOMETRA, Göttingen, Dtl.	Voltmeter Standard Power Pack P25, Power Pack P25 T; Gelelektrophoresekammer Agagel Maxi
BIOHIT, Helsinki, Finnland	Multipipette 10-300 l e 300
BIORAD, München, Dtl.	ICycler Thermal Cycler; C1000 Thermal Cycler; S1000 Thermal Cycler; CFX96 Real-Time System; Gießstände; Voltmeter Power Pac Universal Supply; Gelelektrophoresekammern (Sub Cell GT, Mini Sub Cell GT, Wide Mini Sub Cell GT)
BIOTEK, Bad Friedrichshall, Dtl.	Synergy 4, Take3-Platte
CARL ZEISS MICROSCOPY GmbH, Göttingen, Dtl.	Stereomikroskop Stemi DV4
EPPENDORF, Hamburg, Dtl.	Multipette Xstream; Kolbenhubpipetten Eppendorf Research: 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 500-5000 l; Zentrifuge 5415 R; Zentrifuge 5430 R (Rotoren: FA-45-30-11, A-2-MTP, F-35-6-30)
HEIDOLPH, Schwabach, Dtl.	Vortex REAX 2000
HERAEUS SEPATECH, Osterode, Dtl.	Biofuge pico; Biofuge 13
HIRSCHMANN LABORGERÄTE GmbH & Co. KG, Eberstadt, Dtl.	Akkubetriebene Pipettierhilfe Pipetus
IKA, Staufen, Dtl.	Magnetrührer IKAMAG-RET; IKA Vortex Genius 3
KNF NEUBERGER AG, Freiburg, Dtl.	Vakuumpumpe
KNICK, Berlin, Dtl.	pH-Meter 761 Calimatic
KÖTTERMANN, Uetze/Hänigsen, Dtl.	Wasserbad
LMS-GROUP, Tokyo, Japan	Minizentrifuge MCF-2360
MACHEREY-NAGEL, Düren, Dtl.	NucleoVac 96 Vacuum Manifold
MATERIAL zum Sammeln der Zecken	Baumwollflagge (1,20 m × 0,50 m) am Holzstiel
MEMMERT GmbH + Co. KG, Schwabach, Dtl.	Wasserbäder
PCE DEUTSCHLAND GmbH, Meschede, Dtl.	Umwelt-Messgerät PCE-222

Material und Methoden

Bezugsquelle	Gerät
PROMEGA, Madison, USA	MagneSphere Technology Magnetic Separation Stand; Maxwell 16 Research Instrument System
SARTORIUS LABORATORY, Göttingen, Dtl.	Waage Acculab ALC-1100.2
SCOTSMAN, Mailand, Italien	Flockeneisbereiter Scotsman AF 100
SHARP, Hamburg, Dtl.	Großraummikrowelle
SHP STERILTECHNIK AG, Magdeburg, Dtl.	Autoklav
SONY, Berlin, Dtl.	Digital Graphic Printer UP-D897
SYNGENE, Cambridge, Großbritannien	Geldokumentation G.Box
THERMO SCIENTIFIC, Bonn, Dtl.	Sicherheitswerkbank MSC-Advantage; Wärmeschüttelschrank MAX Q 6000
TKA Wasseraufbereitungssysteme, Niederelbert, Dtl.	TKA-Gen Pure
VWR, Darmstadt, Dtl.	Pipettierhilfe Pipetus; Gas-Sicherheitsbrenner Gasprofi 1 SCS Micro

3.1.7 Primer und Sonden

Bezeichnung	Sequenz	Referenz
IGS-MGB Borrelia for (FP) IGS-MGB Borrelia rev (RP) IGS-MGB Borrelia Sonde	5' TCCTAGGCATTCACCATAGACT 3' 5' TGGCAAATAGAGATGGAAGAT 3' 6-FAM-ATTACTTTGACCATATTT-MGBNFQ	Strube et al. (2010)
hbb640 (FP) hbb Bw (RP)	5' GTAAGGAAATTAGTTTATGTCTTT 3' 5' TAAGCTCTTCAAAAAAAGCATCTA 3'	Schreiber et al. (2014), modifiziert nach Portnoi et al. (2006)
E+Afor (FP) E+Arev (RP)	5' GGGGATGATGTCAARTCAGCAY 3' 5' CACCAGCTTCGAGTTAAGCCAAT 3'	Krücken et al. (2013), modifiziert nach Tabar et al. (2009)
Rmasglta863up (FP) CS409d (FP) Rmasglta1065lo (RP)	5' GCTAAAGCTAAGGATAAAAATGAT 3' 5' CCTATGGCTATTATGCTTGC 3' 5' TCAATAAAATATTCATCTTTAAGAGC 3'	Schreiber et al. (2014)
BabFOR (FP) BabREV2 (RP)	5' TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAT 3' 5' AGCCRAGACATCCAYCGCTGAAA 3'	Selbst entwickelt

3.2 Methoden

3.2.1 Sammeln von Zecken

3.2.1.1 Methodik und Intervalle

Vier verschiedene Standorte in Berlin und dessen Umland (Abb. 1) wurden bei günstigen Witterungsbedingungen in einem Intervall von zwei Wochen über zwei Beobachtungsjahre hinweg auf Zecken untersucht. Bei einer feuchten oder schneebedeckten Vegetation sowie bei Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes wurde der Probennahmetermin verschoben. Sowohl 2010 als auch 2011 belief sich der zeitliche Rahmen der Probennahme von Anfang März (2011) bzw. Ende März/Anfang April (2010) bis November. Eine Dokumentation der Aktivität während der Wintermonate wurde ebenfalls angestrebt, wurde aber im Winter 2010/2011 aufgrund des schnee- und frostreichen Wetters nur eingeschränkt in den Monaten Dezember bis einschließlich Februar durchgeführt. Aus diesem Grund wurde der Standort Güterfelde über den zunächst geplanten Rahmen hinaus zusätzlich von Dezember 2011 bis Anfang April 2012 beprobt und weitere Daten gesammelt. Die Zecken wurden mithilfe der Flaggen-Methode gefangen. Bei dieser Methode wird ein an einem Stiel befestigtes weißes Baumwolltuch (1,20 m × 0,50 m) über die Vegetation gezogen. Das Verharren wirtssuchender adulter Buntzecken in höheren Vegetationsschichten (Ø Wartehöhe 45-70 cm) und deren Aktivierung durch verschiedene Reizeinflüsse (u. a. Erschütterungen, Beschattung), welche auch Wirte generieren, erklären die Funktionsweise dieser Sammelmethode. Juvenile Stadien werden aufgrund des Vorkommens in Erdbodennähe mit dieser Methode in der Regel nicht erreicht. Nach 10-20 Schritten wurde die Flagge gewendet und anhaftende Zecken in ein 50 ml Falcon zum Transport überführt. An jedem Termin wurde eine Fangdauer von einer Stunde angestrebt. Dabei wurde ein festes Streckennetz durch ein und dieselbe Person abgelaufen. Die Schrittgeschwindigkeit und Schrittlänge (ca. 1 m) wurden möglichst konstant gehalten. Um eine Reduktion der Zeckenzahl durch das wiederholte Beflaggen ein und derselben Fläche über einen langen Zeitraum zu vermeiden, wurden schmale Wege (Flaggenbreite) beprobt, wodurch eine Migration der Zecken aus dem anliegenden Vegetationsstück möglich wäre. Der Fangzeitpunkt variierte in Abhängigkeit von der Jahreszeit: während an heißen Sommertagen in den Morgen- bzw. Abendstunden geflaggt wurde, erfolgte die Probennahme in den verbleibenden Monaten ca. zwischen 11-15 Uhr. Mithilfe eines tragbaren Messgerätes (PCE-222, PCE Deutschland GmbH) wurde an jedem Fangtermin einmalig die lokale relative Luftfeuchtigkeit und Temperatur gemessen. Das Gerät wurde konstant in einer durchschnittlichen Höhe von 20 cm über dem Boden positioniert und befand sich damit zum Großteil des Jahres (Ausnahme: Winter; Fangtermin direkt nach dem Mähen der Vegetation) innerhalb der Vegetation. Zudem erfolgte die Dokumentation der Wetterverhältnisse und der Fangdauer.

3.2.1.2 Sammelgebiete

Die beprobten Standorte lagen zum einen im Randgebiet von Berlin (Gatow, Falkenberg) und zum anderen im nahe gelegenen Umland in Brandenburg (Güterfelde, Königs Wusterhausen) (Abb. 1).

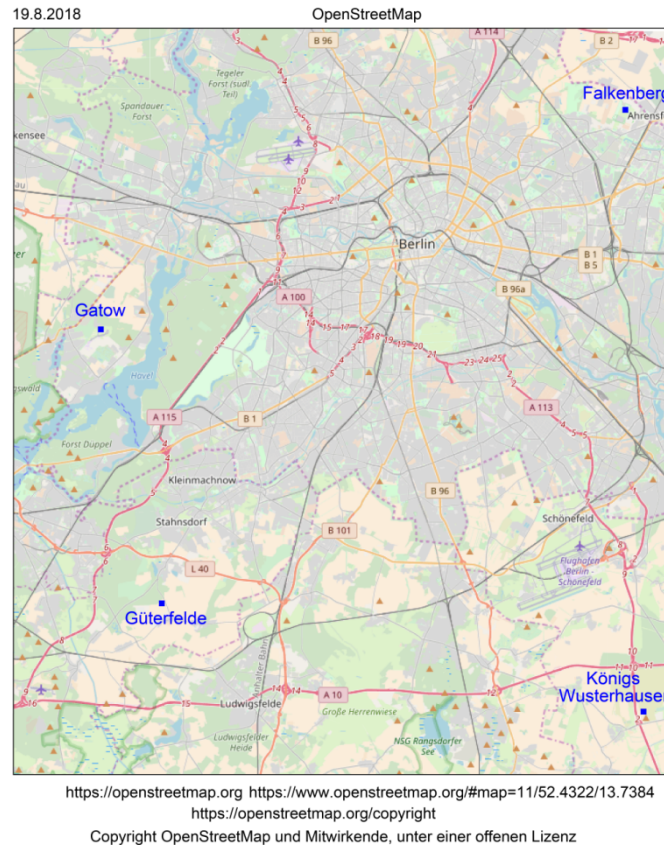


Abb. 1: Darstellung der Standorte im Berliner Umland zur Sammlung von *D. reticulatus*

Die Standorte wurden entsprechend dem bevorzugten Habitat von *D. reticulatus* (Kapitel 2.1.2) ausfindig gemacht. Demnach wurden Probesammlungen auf brachliegenden Flächen, die sich durch relativ wenig Baumbewuchs auszeichneten, durchgeführt. Diese Bedingungen fanden sich vor allem auf den in der Umgebung Berlins gelegenen Rieselfeldern, die bis in die 1970er Jahre zur Abwasserklärung der Stadt genutzt wurden. Die damit herbeigeführte Kontamination mit Schwermetallen wie Blei und Cadmium (www.stadtentwicklung.berlin.de/umwelt/umweltatlas/d110_03.htm#RTFTtoC4) machte die Flächen für die weitere Nutzung durch den Menschen weitestgehend unbrauchbar. Die Standorte Güterfelde, Falkenberg und Königs Wusterhausen bildeten entsprechende Habitats. Der Standort Gatow unterschied sich strukturell von den übrigen Standorten, da er landschaftlich als Heidelandschaft einzuordnen war. Aufgrund von Hinweisen einer ansässigen Tierärztin wurde auch hier eine Probesammlung durchgeführt und das Vorkommen der Buntzecke bestätigt. Zur Veranschaulichung zeigt Abb. 2 fotografische Aufnahmen aller Standorte.

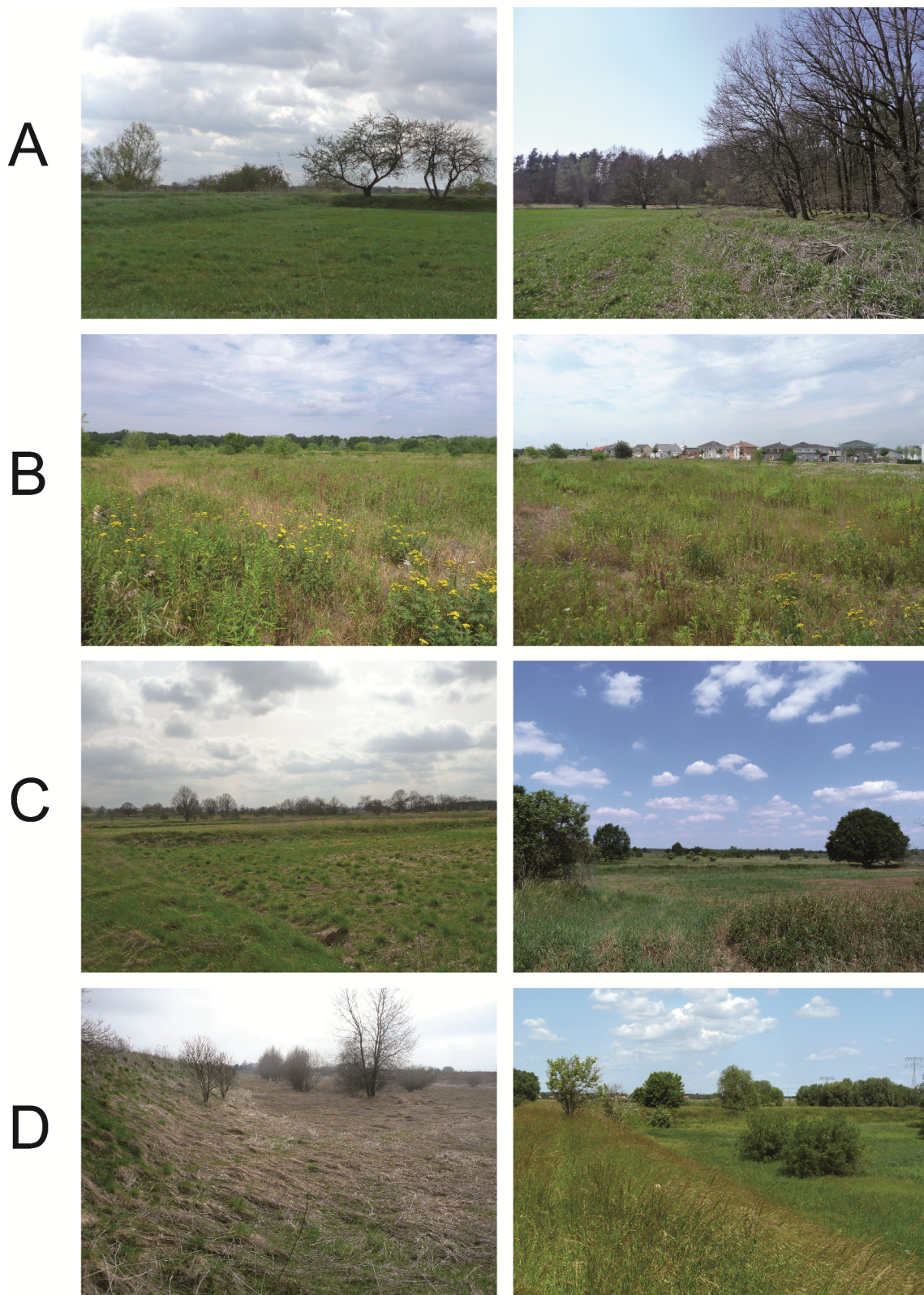


Abb. 2: Fotografische Aufnahmen der beprobten Standorte
A) Güterfelde, B) Gatow, C) Königs Wusterhausen, D) Falkenberg

Güterfelde

Der Standort Güterfelde (N 52° 21.019', E 13° 11.621') liegt im Bundesland Brandenburg, südwestlich von Berlin. Dieses Rieselfeld war aus zahlreichen ca. 60 × 60 m großen Parzellen, die durch 1 m hohe Wälle voneinander getrennt waren, zusammengesetzt. Während die Flächen im Frühsommer einmalig gemäht wurden, blieben die Wälle das ganze Jahr unbewirtschaftet. Die Felder lagen außerhalb von Siedlungsgebieten. Sie wurden im Norden durch einen Mischwald und im Süden durch Koppeln eines ansässigen Reiterhofs begrenzt. Gelegentliche Beobachtungen von Hundebesitzern und Reitern kennzeichneten Güterfelde in geringem Maße als Erholungsgebiet. Gesammelt wurde an den Randgebieten der Parzellen, da zum Zentrum der Flächen hin eine geringere Aktivität der Zecken beobachtet wurde.

Gatower Heide

Die Gatower Heide (N 52° 28.685', E 13° 8.119'), in der ein 400 m × 100 m großes Gebiet stichprobenartig untersucht wurde, liegt innerhalb der nordwestlichen Stadtgrenze Berlins. Angrenzend an das Sammelgebiet lagen ein schmaler Mischwaldstreifen, ein militärhistorisches Museumsgelände, Pferdekoppeln und eine Einfamilienhaussiedlung. Im Vergleich zu den anderen drei Fangorten wurde das Gebiet intensiv als Naherholungsgebiet genutzt. Häufiges Sichten von Rotten sowie der stellenweise stark durchwühlte Boden ließen eine stabile Schwarzwildpopulation in diesem Areal vermuten. Mit Ausnahme einzelner Wege, die die Fläche als Wanderwege durchzogen, wurde die Vegetation in diesem Gebiet zu keinem Zeitpunkt im Jahr gekürzt.

Königs Wusterhausen

Der Standort Königs Wusterhausen (N 52° 17.767', E 13° 33.878'; im Folgenden K. Wusterh.) stellt ebenfalls ein ehemaliges Rieselfeldgebiet dar und liegt südöstlich von Berlin in Brandenburg. Das weitläufige Gelände war im Westen und Norden von Autobahnen umgeben, im Süden und Osten grenzten landwirtschaftlich genutzte Ackerflächen. Der Standort lag ungefähr 700 m von der nächsten Siedlung entfernt. Das während der Probenentnahme abgelaufene Streckennetz variierte zwischen den Jahren 2010 und 2011. In beiden Jahren wurden rieselfeldtypische Parzellen und Wege untersucht. Drei der im Jahr 2010 beprobten und durch ein hohes Zeckenaufkommen gekennzeichneten Parzellen, wurden gegen Ende des Jahres im Rahmen eines anderweitigen Forschungsprojektes kultiviert (Anbau von Robinien und Pappeln, regelmäßige Pflegearbeiten). Folglich wurde auf Ersatzflächen ausgewichen. Alle Flächen wurden, bis auf einmal jährliches Mähen, nicht bewirtschaftet. Auch als Naherholungsgebiet spielte K. Wusterh. keine Rolle.

Falkenberg

Bei dem Standort Falkenberg handelt es sich ebenfalls um ein ehemaliges Rieselfeld, welches innerhalb der nordöstlichen Stadtgrenze Berlins liegt (N 52° 34.716', E 13° 33.421'). Im Unterschied zu den übrigen Rieselfeldstandorten bestand die Fläche aus einem einzigen Sickerbecken (300 m × 150 m), umgeben von einem 3-4 m hohen Wall. Das Innere des Beckens stand zum überwiegenden Teil des Jahres stellenweise unter Wasser und war von einzelnen Baumgruppen aus Silberweiden durchzogen. Durch den fehlenden Baumbewuchs war der Wall starker Sonneneinstrahlung ausgesetzt. Da dieses Gebiet dem Naturschutz unterstand, fanden keinerlei Pflegemaßnahmen statt. An die Fläche grenzten ein durch schottische Hochlandrinder beweidetes weiteres Becken, Koppeln mit Pferde- und Heckrinderhaltung sowie eine Einfamilienhaussiedlung. Das dem Naturschutz unterliegende Gebiet durfte nur auf den gekennzeichneten Wegen betreten werden. Trampelpfade im Umkreis des Aussichtspunktes wiesen jedoch auf eine regelmäßige Begehung des Geländes hin. Wanderwege in direkter Umgebung zum Sickerbecken boten Spaziergängern und ihren Hunden aus der benachbarten Siedlung bzw. dem nahe gelegenen Tierheim entsprechende Erholungsmöglichkeiten. Das Sickerbecken wurde auf dem Wall und im trockenen südöstlich gelegenen Bereich des Beckeninneren beprobt. Darüber hinaus wurden die Zecken auf einer nördlich angrenzenden Wiese und einem östlich gelegenen Wanderweg gefunden.

3.2.2 Identifizierung der Zeckenspezies und des Geschlechts

Alle geflaggtten Zecken wurden im Labor bezüglich ihrer Spezies identifiziert. Die Abgrenzung von adulten *D. reticulatus* zu *Ixodes* spp. war aufgrund der Größe und der Farbgebung mit dem bloßen Auge möglich (Babos 1964). Die Abgrenzung zur Schafzecke *Dermacentor marginatus* erforderte hingegen die stereomikroskopische Untersuchung (Zeiss) unter 32-facher Vergrößerung. Als Differenzierungsmerkmal wurde zum einen der jeweils an der dorsalen Seite des zweiten Palpengliedes befindliche nach hinten gerichtete Dorn bei *D. reticulatus* herangezogen. Zum anderen stellt die tief eingeschnittene Coxa I mit ihrem kräftigen Dorn ein spezifisches Merkmal dieser Zeckenspezies dar (Babos 1964). Die Einteilung in männliche und weibliche Zecken wurde sowohl für *D. reticulatus* als auch für *I. ricinus* makroskopisch anhand der geschlechtsspezifischen Körpergröße, Farbgebung und Größe des Rückenschildes vorgenommen. Anschließend wurde jede Zecke in ein separates 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, beschriftet und bei -80 °C asserviert.

3.2.3 DNA-Isolation

3.2.3.1 Bestimmung der Anzahl der Zecken für die DNA-Isolation

In der Studie wurde eine Stichprobe von 2000 adulten weiblichen Buntzecken untersucht. Um eine repräsentative Anzahl zu analysierender Zecken für jeden Fangtag zu ermitteln, wurde zu Beginn der Laborarbeiten folgender Berechnungsansatz erstellt: Sowohl 2010 als auch 2011 sollte die Untersuchung von 1000 Buntzecken erfolgen, wobei auf jeden Standort 250 Zecken pro Jahr entfielen. Aufgrund des bimodalen Aufkommens adulter *D. reticulatus* im Jahresverlauf, wurden die 250 zu untersuchenden Zecken jeweils in zwei Gruppen pro Jahr unterteilt (125 Zecken/Jahreshälfte). Abschließend wurde die repräsentative Untersuchungszahl pro Fangtag durch Multiplikation der Anzahl geflaggter weiblicher Buntzecken/Tag mit dem nach folgender Formel berechneten Prozentwert ermittelt:

$$W/G \times 100 = \text{Prozentwert zur Berechnung der Zeckenanzahl an Tag X}$$

G = Anzahl gesammelter Zecken pro Jahreshälfte

W = zu untersuchende Zecken pro Jahreshälfte (n=125)

Im Laufe der Studie zeigte sich, dass die Anzahl weiblicher geflaggter Buntzecken zum Teil für das oben stehende Berechnungsmuster nicht ausreichte. Demnach wurde in der Jahreshälfte I 2010 die angestrebte Anzahl von 125 Exemplaren an keinem der Fangorte erreicht. Die Zeckenzahlen der Jahreshälfte II 2010 wurden um die fehlende Differenz ergänzt und ebenfalls nach oben stehender Formel berechnet. Darüber hinaus kamen im Jahr 2010 am Standort Falkenberg keine 250 *D. reticulatus* zusammen. Alle vorhandenen weiblichen Buntzecken wurden für die DNA-Isolation verwendet und die fehlenden 19 Individuen aus den Zeckenfängen 2010 der übrigen Standorte gleichermaßen ergänzt. Eine Auflistung der Anzahl der für die DNA-Extraktion verwendeten Zecken/Fangtag findet sich in Tab. 24 bis Tab. 27 im Anhang.

3.2.3.2 DNA-Isolationsverfahren

Sammelzeitraum 2010

Um eine große Anzahl an Zecken (n=48) in einem Durchgang zu bearbeiten, wurde das NucleoSpin 8 Blood Kit von der Firma MACHEREY-NAGEL unter Verwendung des NucleoVac 96 Vacuum Manifold-Systems, welches mit einer Vakuumpumpe gekoppelt war, verwendet. Zunächst wurde der Chitinpanzer der Zecken aufgebrochen, um die Nukleinsäuren im anschließenden Extraktionsprozess leichter zugänglich zu machen. Dazu wurden die im 1,5 ml Reaktionsgefäß befindlichen Zecken mit 50 µl PBS-Puffer versetzt und mit einem separaten sterilen Pistill gemörsert. Das Homogenat wurde mit 25 µl Proteinase K und 200 µl Puffer BQ1 durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren vermischt. Das Enzym und

Material und Methoden

das im Puffer befindliche Guanidiniumhydrochlorid bewirken die Zellyse und den Proteinabbau. Im Thermoschüttler erfolgte über Nacht die Inkubation der Ansätze bei 56 °C und 900 rpm. Anschließend wurden die Ansätze mit 200 µl 99,8%igem Ethanol versetzt und auf die NucleoSpin Blood Binding Strips überführt, wo die Bindung der DNA an die Silika Matrix erfolgt. Nicht abgebaute Bestandteile des Zeckenkörpers wurden verworfen. Im Anschluss wurden unerwünschte Zellbestandteile durch Zugabe verschiedener Waschpuffer und Anlegen eines Vakuums entfernt. Nach einem einmaligen Waschschrift mit 150 µl Puffer B5 (Vakuum -0,2 bar, 5 min), wurde die DNA durch Zugabe von 600 µl und 900 µl BW Puffer zweimal gereinigt (Vakuum jeweils -0,2 bar, 3 min bzw. 1 min). Zum Abschluss wurden die Säulen erneut mit Puffer B5 belegt (900 µl, -0,2 bar, 1 min). Zur Entfernung sämtlicher Pufferreste wurden die Säulen durch Anlegen eines Vakuums von -0,6 bar für 10 min getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe von 70 µl BE-Puffer, welcher zur Verbesserung der DNA-Ausbeute zuvor auf 70 °C erwärmt wurde. Der Elutionspuffer inkubierte auf den Säulen zunächst 5 min bei Raumtemperatur. Im letzten Schritt wurde erneut ein Vakuum angelegt (-0,6 bar, 2 min) und die DNA in die zuvor platzierten Tube Strips überführt. Die gewonnene DNA wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

Sammelzeitraum 2011

Die DNA der im Jahr 2011 gesammelten weiblichen Buntzecken wurde mithilfe des neu zur Verfügung stehenden automatisierten Maxwell 16 Systems der Firma PROMEGA extrahiert. Das System basiert ebenfalls auf der vorübergehenden Bindung der DNA an eine Silikamatrix, die in diesem Fall einen Eisenkern ummantelt und sogenannte Magnetic beads bildet. Verwendet wurde das Maxwell 16 LEV Blood DNA Kit (PROMEGA), welches alle notwendigen Puffer und Enzyme zur Verfügung stellte. Zur Vorbereitung der Proben wurden 200 µl Lysispuffer zu den gefrorenen Zecken gegeben und diese jeweils mit einem separaten Pistill homogenisiert. Zum Aufschließen der Zellen wurden anschließend 30 µl Proteinase K und weitere 200 µl Lysispuffer zugesetzt. Nach dem Vortexen wurde der Ansatz 10 min bei 70 °C und 900 rpm im Thermoschüttler gemischt. Anschließend wurden die Proben mit 300 µl Lysispuffer aufgefüllt und auf dem Vortex gemischt. Um das Überführen fester Zeckenpartikel in die Maxwell 16 LEV DNA Purification Kartuschen und eine damit beobachtete Blaufärbung des gewonnenen DNA-Eluats zu vermeiden, wurde der Ansatz zwei Minuten bei 5800 × g zentrifugiert. Vorbereitend wurden jeweils 50 µl Elutionspuffer in die in dem Gerät entsprechend platzierten Elutionsgefäße pipettiert. Unter dem Programm „DNA/Blood“ führte das Gerät selbstständig alle Reinigungs- und Elutionsschritte zur DNA-Gewinnung durch. Aufgrund gelegentlich zurückbleibender Magnetic Beads im Eluat wurden im Anschluss sämtliche Tubes für 5 min in den MagneSphere Technology Magnetic

Separation Stand überführt. Durch die Magnetwirkung wurden die Beads fixiert und das Eluat konnte in sterile beschriftete 0,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert werden. Die Lagerung der gewonnenen DNA erfolgte bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C.

3.2.3.3 Bestimmung der Quantität und Qualität der gewonnenen DNA

Im Anschluss an die DNA-Isolation wurde jede Probe hinsichtlich der Quantität und Qualität ihres Nukleinsäuregehaltes in einer Take3-Platte im Synergy 4 (BIOTEK) mithilfe der Software Gen5 photometrisch untersucht. Im Vorfeld der Untersuchungen wurde das Gerät mit 2 µl des bei der DNA-Isolation eingesetzten Elutionsmediums kalibriert. Anschließend wurden 2 µl jeder Probe auf die Take3 Multi-Volume Platte (BIOTEK) pipettiert und die gesuchten Parameter durch Messungen der Absorption bei 260, 280 und 320 nm ermittelt.

Im Wellenlängenbereich von 260 nm absorbieren die Basen der Nukleinsäuren. Bei 280 nm liegt hingegen das Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} (OD = Optische Dichte) lässt damit auf den Reinheitsgrad der Probe schließen. Optimalerweise liegt der Quotient im Bereich zwischen 1,8 und 2. Niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung der Proben mit Proteinen hin, höhere Werte lassen auf eine Verunreinigung mit carboxygruppenhaltigen Substanzen, die ebenfalls bei 260 nm absorbieren, schließen. Die Messung der Absorption bei 320 nm liefert weitere Aussagen über den Reinheitsgrad der Proben. Je dichter der Messwert an Null liegt, desto weniger ist die Probe mit absorbierenden Puffern oder sonstigen eintrübenden Stoffen verunreinigt.

Die Bestimmung der Menge der extrahierten DNA wurde automatisch mit der nachfolgenden Formel errechnet: $\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = (OD_{260} - OD_{320}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g/ml}$. Die Formel basiert auf der Tatsache, dass die optische Dichte einer reinen doppelsträngigen DNA mit einem Gehalt von 50 µg/ml bei der Wellenlänge von 260 nm 1 beträgt. Die Ergebnisse der Nukleinsäuremessung wurden in ng/µl wiedergegeben. Eluate, deren Reinheitsgrad außerhalb von 1,6-2,3 lag, wurden nicht in die nachfolgenden Erregeruntersuchungen einbezogen, sondern durch weitere DNA-Extraktionen überzähliger Zellen des gleichen Zeitraumes und Standortes ersetzt.

3.2.4 Erregernachweis: Grundlagen und Prinzip

3.2.4.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Proben mit einem entsprechenden Reinheitsgrad wurden in die Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Untersuchung auf *Babesia* spp., *Borrelia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Cand. Neoehrlichia mikurensis* und *Rickettsia* spp. eingesetzt. Die PCR dient der gezielten Vervielfältigung von DNA-Fragmenten und bildet damit ein grundlegendes diagnostisches

Nachweisverfahren. Das Verfahren besteht in der Regel aus 20-40 Zyklen, die sich aus einer Abfolge von drei sich wiederholenden Schritten zusammensetzen. Zunächst wird die vorliegende doppelsträngige Ausgangs-DNA (Template) durch Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen in ihre Einzelstränge aufgetrennt (= Denaturierung). Anschließend lagern sich Primer, ca. 18-30 bp lange Oligonukleotide, an die komplementären Bereiche der aufgetrennten DNA an (= Annealing) und bilden den Startpunkt zur Vervollständigung des Einzelstranges, welche sofort beginnt. Die verwendeten Primer wurden im lyophilisierten Zustand bei der Firma INVITROGEN angefordert und als 100 µM konzentrierte Stocklösung bei -20 °C aufbewahrt. Eine thermostabile DNA-Polymerase baut nun, beginnend am 3'-OH-Ende beider Primer, die DNA durch den Einbau komplementärer Basen wieder zum Doppelstrang auf (= Elongation). Jeder Teilschritt wird bei einer bestimmten Temperatur für eine bestimmte Dauer durchgeführt, wobei die Größe des Templates, die Beschaffenheit der Primer und auch das verwendete Enzym maßgeblichen Einfluss haben. Die konventionelle PCR verkörpert das Basis-PCR-Verfahren, dessen Produkte über die Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.9) ausgewertet werden können. Im Rahmen einer real-time PCR können die Produkte durch den Einsatz eines fluoreszierenden und an doppelsträngige DNA bindenden Farbstoffs oder einer speziellen Sonde hingegen in Echtzeit und direkt bezüglich ihrer Quantität bestimmt werden (Kapitel 3.2.6.2).

In dieser Studie wurde zum Nachweis der verschiedenen Erregergruppen eine Vielzahl spezifischer PCRs durchgeführt, wobei in den überwiegenden Fällen konventionelle Verfahren angewandt wurden. Die PCR-Bedingungen werden unter den jeweiligen Kapiteln besprochen. Bei der Durchführung aller PCR-Ansätze wurde das Kontaminationsrisiko so gering wie möglich gehalten. Sämtliche Reagenzien wurden im Vorfeld aliquotiert. Die Anfertigung des Mastermixes und die Zugabe des Templates erfolgten in separaten Räumen. Zur Kontrolle der PCRs wurden in jedem Ansatz Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Um Kreuzkontaminationen mit der Positivkontrolle und damit falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurden die Kontrollen so gewählt, dass die verwendete Spezies nach aktuellem Kenntnisstand möglichst nicht bzw. nur selten in *D. reticulatus* vorkam. Für die Negativkontrolle wurde dem Ansatz anstelle der Template DNA ein entsprechendes Volumen DEPC-Wasser zugesetzt. In allen PCR-Assays wurde das Template in einer Konzentration von ca. 60-120 ng/µl verwendet. Höher konzentrierte Proben wurden im Vorfeld der PCR-Untersuchung entsprechend mit DEPC-Wasser verdünnt. Bei Proben niedrigerer Konzentration wurde die Menge des Templates erhöht. Die Aufbewahrung der Proben bis zur Weiterverarbeitung erfolgte in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei 4 °C (Verarbeitung am selben Tag) oder -20 °C.

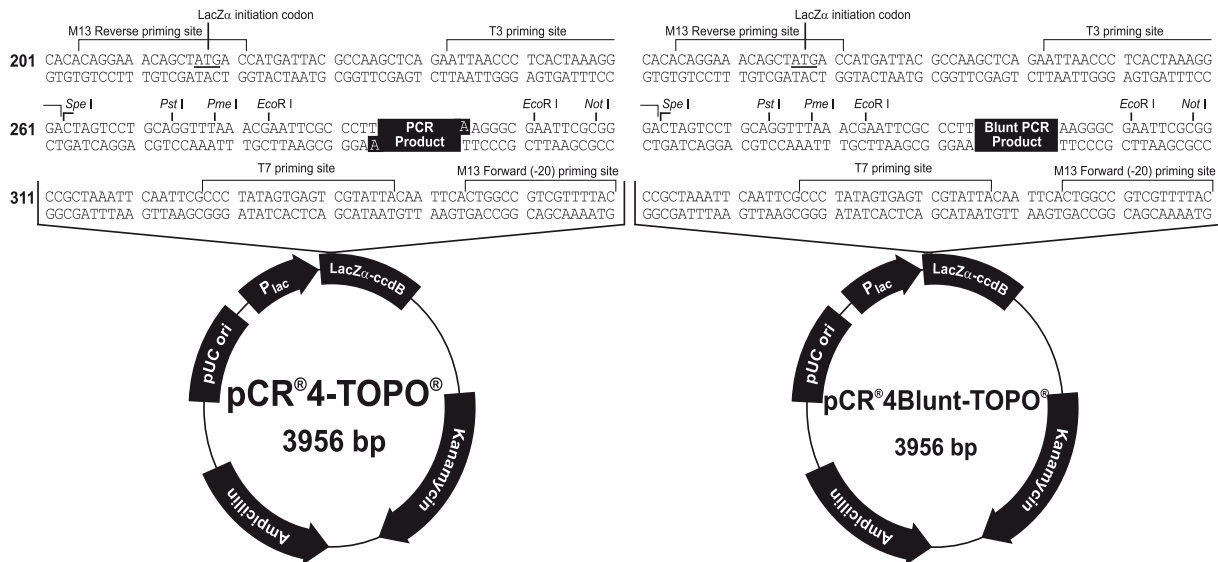
3.2.4.2 Herstellung von Positivkontrollen

Vervielfältigung durch Klonierung

Der erfolgreiche Ablauf jeder PCR wurde durch den Einsatz einer Negativ- und Positivkontrolle überprüft. Um Material für die Positivkontrollen in ausreichender Menge zu gewinnen, wurden aus der vorhandenen DNA der verschiedenen Erreger Plasmide hergestellt. Während die Borrelien- und Rickettsien-Plasmide bereits aus anderen Studien zur Verfügung standen, mussten die Piroplassen- und Anaplassen-Plasmide zunächst neu hergestellt werden. Als Ausgangsmaterial lagen Blutproben Anaplassen- bzw. Piroplassen-infizierter Tiere vor. Die Spezies entsprachen *A. phagocytophilum*, *Babesia rossi* und *B. microti*. In Vorbereitung der Klonierung wurde im ersten Schritt die DNA aus den Blutproben unter Verwendung des NucleoSpin Blood Kits von der Firma MACHEREY-NAGEL gemäß Herstellerangaben isoliert. Die Zielsequenzen innerhalb der extrahierten DNA wurden anschließend durch Anwendung der erregerspezifischen PCR-Verfahren (siehe Kapitel 3.2.5 bis 3.2.8) vervielfältigt und die Produkte entsprechend Kapitel 3.2.10.1 aufgereinigt. Bevor das Material in die Klonierungsreaktion eingesetzt wurde, wurde der Erfolg der DNA-Aufreinigung mittels Gelelektrophorese überprüft (Kapitel 3.2.9) und die Konzentration in der Take3-Platte im Synergy 4 (BIOTEK) Plattenphotometer (BIOTEK) bestimmt.

Für die Klonierung wurde in Abhängigkeit von der zuvor verwendeten Polymerase das TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Maxima Hot Start *Taq* DNA Polymerase) oder das Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Phusion Hot Start II Polymerase) verwendet. Das Prinzip beruht auf dem Einbau des aufgereinigten und zu klonierenden Fragmentes in einen Plasmid-Vektor (TOPO TA Cloning Vektor PCR 4 TOPO bzw. pCR 4Blunt-TOPO Vektor), welcher wiederum in *Escherichia coli* Zellen transformiert und mit der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben wird. Beide Plasmid-Vektoren hatten eine Größe von 3956 bp und bestanden aus verschiedenen Funktionseinheiten, die sicherstellen sollten, dass ausschließlich Bakterien mit erfolgreich eingeschleustem Insert vermehrt werden (Abb. 3). Diese Funktion wurde unter anderem durch das an das LacZ α -Fragment gebundene *ccdB*-Gen gewährleistet. Bei Nichteinbau des Fragmentes in das Plasmid wird dieses Gen hingegen exprimiert und führt über die Inhibition der bakteriellen Gyrase zum Absterben der Zellen. Zudem verfügten die Plasmide über resistenzvermittelnde Regionen gegen Ampicillin und Kanamycin. Erfolgreich transformierte Zellen wuchsen dementsprechend auch bei Zugabe der Antibiotika zum Wachstumsmedium.

Material und Methoden



Comments for both vectors (3956 nucleotides): *lac* promoter region: bases 2-216; CAP binding site: bases 95-132; RNA polymerase binding site: bases 133-178; Lac repressor binding site: bases 179-199; Start of transcription: base 179; M13 Reverse priming site: bases 205-221; LacZ α -*ccdB* gene fusion: bases 217-810; LacZ α portion of fusion: bases 217-497; *ccdB* portion of fusion: bases 508-810; T3 priming site: bases 243-262; TOPO® Cloning site: bases 294-295; T7 priming site: bases 328-347; M13 Forward (-20) priming site: bases 355-370; Kanamycin resistance gene: bases 1159-1953; Ampicillin (*b/a*) resistance gene: bases 2203-3063 (*c*); Ampicillin (*b/a*) promoter: bases 3064-3160 (*c*); pUC origin: bases 3161-3834; (*c*)=complementary strand

Abb. 3: Vektor-Karten der bei der Klonierung von DNA-Material verwendeten Vektoren. Grafik wurde auf Basis der Darstellungen unter www.thermofisher.com modifiziert. ©2018 Thermo Fisher Scientific Inc. Used under permission.

Der wesentliche Unterschied beider Plasmide besteht in der Struktur der Insertionsstelle am linearisierten Plasmid. Der TOPO TA Cloning Vektor PCR 4 TOPO trägt ein überhängendes Thymidin und ermöglicht damit die Bindung an die durch *Taq* Polymerasen erzeugten Adenosinschwänze der PCR-Produkte (sogenannte sticky ends). Dahingegen binden die glatten Enden (blunt ends) der Insertionsstelle des pCR 4Blunt-TOPO Vektors die ebenfalls glatten Enden der durch die Phusion Hot Start II Polymerase erzeugten Amplifikate. Dieser Einbau des Fragmentes in das jeweilige Plasmid wird durch eine kovalent gebundene Topoisomerase katalysiert und als Ligation bezeichnet. Für die Ligation wurden 0,5 μ l Salt Solution (INVITROGEN), 0,5 μ l Vektor PCR 4 TOPO (INVITROGEN) und 2 μ l PCR-Produkt vermengt und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Beendigung des Ligationsschrittes wurde durch Überführung des Reaktionsansatzes auf Eis herbeigeführt. Anschließend wurden die Plasmide in One Shot TOP10 chemisch kompetente *E. coli* Zellen überführt (= Transformation) und damit die Grundlage für eine intensive Vermehrung geschaffen. Dazu wurden 2 μ l des Ansatzes zu den auf Eis aufgetauten TOP10 Zellen gegeben, vorsichtig mit der Pipettenspitze verrührt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die anschließende Hitzeschock-Transformation für 30 sec in einem 42 °C warmen Wasserbad begünstigte die Aufnahme des Plasmids in die kompetenten Zellen. Die *E. coli* Zellen wurden

Material und Methoden

mit 250 µl eines vorgewärmten S.O.C. Mediums aufgefüllt und im Wärmeschüttelschrank bei 200 rpm und 37 °C über 1 Stunde hinweg herangezogen. Anschließend wurde die Zellsuspension auf zuvor angefertigte LB-Agarplatten (2 × 20 ml Agar) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Bei der Anfertigung des Agars wurden zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen 20 ml LB-Agar mit 10 µl Antibiotikum versetzt, wobei wahlweise Kanamycin (0,1 g/ml) oder Carbenicillin (0,1 g/ml) verwendet wurde. Carbenicillin gehört ebenso wie Ampicillin zu den β-Lactam Antibiotika, weist aber gegenüber β-Lactamasen eine höhere Stabilität auf, wodurch die Bildung von Satellitenkolonien auf Agarplatten reduziert wird. Zur weiteren Vermehrung der erfolgreich transformierten Zellen wurden am folgenden Tag Bakterienkulturen aus den auf den LB-Agarplatten gewachsenen Kolonien angefertigt. Dazu wurden einzelne Klone jeweils mithilfe einer sterilen Pipettenspitze gepickt. Diese wurden samt der Pipettenspitzen in separate sterile Glasröhrchen überführt, welche zuvor mit 5 ml LB-Medium und 2,5 µl Kanamycin bzw. Carbenicillin (jeweils 0,1 g/ml) befüllt wurden. Im Anschluss wurden die Kolonien bei 37 °C und 200 rpm über Nacht geschüttelt.

Am Folgetag wurde ein Teil der Bakterienkultur zur Anfertigung von Glycerolstocks verwendet. Dazu wurden 500 µl der Bakteriensuspension mit der gleichen Menge autoklavierter Glycerollösung vermischt und für zwei Stunden auf Eis inkubiert. Die Stocks wurden bei -80 °C eingefroren und standen als Reservematerial zur Verfügung. Bei Bedarf konnten die Stocks auf einer LB-Agarplatte mit Antibiotikumzusatz ausgestrichen werden und erneut für die Plasmidgewinnung genutzt werden.

Plasmidpräparation

Der verbleibende Teil der zuvor hergestellten Bakterienkultur wurde zur Isolierung der Plasmide aus den kompetenten Zellen verwendet. Zunächst wurden die Bakterien bei 11000 × g für 3 min herunter zentrifugiert. In den anschließenden Schritten wurden die Zellen unter Verwendung des NucleoSpin Plasmid Kits der Firma MACHEREY-NAGEL lysiert und das freigesetzte Plasmid gereinigt (Miniprep). Mit Ausnahme der Elution des Plasmids mit 50 µl erwärmten Aqua bidest (65 °C) anstelle des mitgelieferten Elutionspuffers, wurden alle Reaktionsschritte entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Größere Plasmidvolumina konnten durch Verwendung des PureYield Plasmid Midiprep Systems der Firma PROMEGA gewonnen werden (Midiprep). Im Unterschied zur Vorbereitung des Miniprep-Verfahrens wurden die transformierten Zellen in zwei jeweils 50 ml LB-Medium enthaltenden Erlenmeyerkolben überführt, welchen ebenfalls die bereits beschriebenen Antibiotikakonzentrationen zugesetzt wurden, und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Das Material wurde dann in 50 ml Falcons überführt, bei 5000 × g für 20 min zentrifugiert und schließlich dem Midiprep-Verfahren nach Herstellerangaben

unterzogen. Auf diese Weise ließ sich Plasmidmaterial vorhandener Positivkontrollen vermehren.

Das aus der Mini- und Midi-Prep gewonnene Plasmid wurde zur Bestimmung der Qualität und Quantität photometrisch in der Take3-Platte im Synergy 4 (BIOTEK) gemessen. Darüber hinaus wurde der erfolgreiche Einbau des gesuchten Inserts überprüft. Dazu wurde das Fragment mithilfe eines Restriktionsenzym an den beidseits gelegenen *EcoRI*-Schnittstellen vom Vektor getrennt. Für den Restriktionsverdau wurden folgende Reagenzien miteinander versetzt: 16,5 µl autoklaviertes Aqua bidest, 2 µl 10 × Puffer *EcoRI* (FERMENTAS), 0,5 µl Restriktionsenzym *EcoRI* (10 U/µl, FERMENTAS) und 1,0 µl Plasmid-DNA. Der Ansatz wurde bei 37 °C für eine Stunde im Wasserbad inkubiert. In der nachfolgenden Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.9) konnte mithilfe der gleichzeitig mitgeführten Größenstandards (1 kb und 100 bp Marker) abgeschätzt werden, ob neben dem Plasmid (3519 bp) auch das Insert mit der zu erwartenden Größe vorhanden war.

Abschließend wurde das Plasmid zur Sequenzierung bei GATC eingeschickt und mithilfe der M13-Standardprimer analysiert. Die erhaltenen Sequenzierungsergebnisse wurden mit der Software Clone Manager Professional 9 bearbeitet und mithilfe der NCBI-Datenbank ausgewertet.

Die zuvor bestimmte Konzentration des isolierten Plasmids mittels Take3-Platte im Synergy 4 diente zudem als Grundlage für die Herstellung von Positivkontrollen mit bekannter Kopienzahl. Ausgehend von der Konzentration und der Plasmidgröße wurde die Anzahl der enthaltenen Plasmidkopien/µl rechnerisch ermittelt. Darauf aufbauend wurde eine Stammlösung von 10⁶ Kopien durch Verdünnung mit DEPC-Wasser hergestellt und bei -80 °C eingefroren. Für die Durchführung der PCRs wurde diese Stammlösung nach Bedarf weiter verdünnt und dementsprechend eine Positivkontrolle mit bekannter Kopienzahl mitgeführt.

3.2.5 Konventionelle PCR-Verfahren zum Nachweis verschiedener Piroplasmen

Die zu erwartenden Prävalenzen in Deutschland waren nach einhergehender Literaturrecherche als gering einzustufen (Kapitel 2.2.1.3). Aufgrund dessen wurden die Zecken zu Pools zusammengefasst und anschließend untersucht. Jeder Pool setzte sich aus fünf Zecken zusammen, die in ihrer DNA-Konzentration maximal um 10 ng/µl divergierten. Das eingesetzte Template entsprach ungefähr einer Konzentration von 60-120 ng/µl. Höher konzentrierte Pools wurden entsprechend verdünnt. Zecken, die einen geringeren DNA-Gehalt aufwiesen, wurden einzeln untersucht. Zur Überprüfung der PCR wurde in jedem Ansatz eine Negativkontrolle sowie Plasmid-DNA von *B. rossi* bzw. später von *B. microti* als Positivkontrolle mitgeführt.

3.2.5.1 PCR zum Nachweis einer Partialsequenz in dem 18S rRNA Gen

Die Erregerprävalenz sollte eingangs unter Verwendung einer auf Basis von Wielinga et al. (2009) publizierten konventionellen PCR zum Nachweis eines Fragmentes des 18S rRNA Gens bestimmt werden. Die im Rahmen dieser Studie modifizierte PCR zielte primär darauf ab alle mit *D. reticulatus* im Zusammenhang beschriebenen Babesien und Theilerien (*B. canis*, *B. caballi*, *T. equi*) zu detektieren. Darüber hinaus sollte eine möglichst große Anzahl v. a. in Europa bedeutender Babesien erfasst werden. Der Nachweis von *B. rossii*, der uns anfangs einzigen zur Verfügung stehenden Positivkontrolle, musste ebenfalls gewährleistet sein. Die Kompatibilität der Primer zu den gesuchten Sequenzen wurde durch das Erstellen eines Alignments überprüft (Software Clone Manager Professional 9 bzw. Mega 7). In der Weiterführung wurde die auf den modifizierten Primern basierende PCR anhand der Annealing-Temperatur und dem Einsatz unterschiedlicher Polymerasen optimiert. Bei der nachfolgenden Untersuchung der Feldproben wurde jedoch ersichtlich, dass die modifizierte PCR vergleichsweise unspezifisch agierte. Die Sequenzierung einer Stichprobe der gebildeten Amplifikate ergab den Nachweis verschiedener Pilze und Flechten. Anhand der Fragmentgrößen waren diese in der Gelelektrophorese schwer von den gesuchten Piroplasmen zu unterscheiden. Folglich wurde diese PCR für die Untersuchung von wirtssuchenden *D. reticulatus* verworfen.

3.2.5.2 PCR zur Detektion der Internal Transcribed Spacer-1 Region

Die PCR zur Detektion der Internal Transcribed Spacer-1 Region (ITS-1 Region) wurde als Alternative zur im Kapitel 3.2.5.1 erläuterten PCR von Grund auf neu entwickelt. Mithilfe der Software Clone Manager Professional 9 wurden Primer erstellt (Tab. 5), welche in den konservierten Bereichen der 18S- und 5,8S rRNA Gene lagerten und das variable ITS-1 Gen flankierten. Die Primer zeigten keine Repeats und keine Bereiche zur Ausbildung von Sekundärstrukturen. Mithilfe eines in Clone Manager Professional 9 bzw. Mega 7 erstellten Alignments wurde die Kompatibilität der Primer zu den einzelnen Spezies bestimmt.

Um eine größtmögliche Sensitivität und Spezifität des Assays zu gewährleisten, wurde die PCR im Vorfeld der eigentlichen Untersuchungen bezüglich ihrer Reaktionskomponenten und Reaktionsbedingungen optimiert. Dazu wurden verschiedene Reaktionsansätze, welche in der Annealing-Temperatur, der verwendeten Polymerase oder in den Primer- und MgCl₂-Konzentrationen variierten, durchgeführt. Entsprechende Erläuterungen sind in den folgenden Abschnitten nachzulesen.

Bestimmung der Annealing-Temperatur und der Polymerase

Zur optimalen Bindung der Primer an die DNA-Einzelstränge ist eine passende Annealing-Temperatur (T_a) erforderlich. Als Faustregel gilt, dass die T_a 3 °C unter der Schmelztemperatur (T_m) des jeweiligen Primers liegt. Zur Orientierung lässt sich die T_m mithilfe einfacher Programme im Internet (z. B. www.thermofisher.com) berechnen. Für Primer mit einer Länge von weniger als 25 bp kann die Formel „ $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$ “ angewendet werden.

Zur genaueren Abklärung wurden verschiedene Reaktionsansätze durchgeführt, bei denen die Amplifikation der Plasmid-DNA von *B. microti* und *B. rossi* unter Verwendung verschiedener Temperaturgradienten (65-75 °C) überprüft wurde. Um zeitgleich die effizienteste Polymerase zu ermitteln, wurde zusätzlich die Phusion Hot Start II Polymerase als auch der Maxima Hot Start *Taq* DNA Polymerase eingesetzt. Anschließend konnte die optimale Annealing-Temperatur über die Intensität der Banden im Gel bestimmt werden.

Bestimmung der MgCl₂- und Primerkonzentration

Die Konzentration von MgCl₂ beeinflusst die Denaturierung der Doppelstränge, die Bindung der Primer während des Annealingschrittes und vor allem die Aktivität der Mg²⁺-abhängigen Polymerasen und spielt somit eine ausschlaggebende Rolle für die Funktionsweise einer PCR. Durch Erhöhung der MgCl₂-Konzentrationen kann die Amplifikationsrate des gewünschten Produktes gefördert werden. Im Gegenzug bewirken zu hoch gewählte Konzentrationen die Bildung unspezifischer Produkte. Zur Optimierung der MgCl₂-Konzentration wurden Reaktionsansätze mit den Konzentrationen 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM und 3,5 mM untersucht.

Im letzten PCR-Optimierungsschritt wurden unterschiedliche Primerkonzentrationen getestet. Folgende Konzentrationen wurden unter der optimierten Annealing-Temperatur und der angepassten MgCl₂-Menge überprüft: 0,2 µM, 0,4 µM, 0,5 µM, 1 µM, 1,4 µM, 2 µM.

Untersuchungen zur Sensitivität der PCR

Zur Bestimmung der Sensitivität der entwickelten PCR wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Zunächst erfolgte die Bestimmung der Detektionsuntergrenze der zuvor hergestellten Plasmide von *B. microti* und *B. rossi* mithilfe zweier verschiedener Enzyme (Maxima Hot Start *Taq* Polymerase; Phusion Hot Start II Polymerase). In einem zweiten Schritt wurden mögliche inhibitorische Effekte ausgehend von der isolierten Zecken-DNA überprüft. Dazu wurden zunächst einzelnen Zeckenisolaten mit einer Konzentration von 60-120 ng/µl 10¹ bis 10⁶ Kopien der oben erwähnten Babesien-Plasmide zugesetzt. Anschließend wurde die Sensitivität der PCR in gleicher Weise in den erstellten Zeckenpools (jeweils 60-120 ng/µl) kontrolliert. Um eine möglichst hohe Sensitivität zu erzielen, wurde der

Material und Methoden

Einsatz verschiedener DNA-Mengen (1-5 µl) aus den Pools untersucht. Aufgrund der unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren in den Jahren 2010 und 2011 wurden die Einzelproben und Pools aus beiden Jahren getestet.

Die Ergebnisse zur Etablierung dieser PCR werden im Detail in Kapitel 4.2.1.2 erläutert. Zum besseren Überblick wird bereits in der nachfolgenden Tab. 5 der 25 µl Reaktionsansatz aufgeführt. Das Temperaturprotokoll sah folgende Schritte vor: Aktivierung der Polymerase bei 95 °C für 4 min, gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus Denaturierung (95 °C, 30 sec), Annealing (67 °C, 30 sec) und Elongation (72 °C, 30 sec). Die abschließende Phase der finalen Extension wurde bei 72 °C für 7 min durchgeführt.

Tab. 5: Reaktionsansatz zur Amplifikation der ITS-1 Region verschiedener *Babesia* spp.

Volumen	Reagenz
2,5 µl	10 × Maxima Hot Start <i>Taq</i> Puffer
2 µl	Magnesiumchlorid (25 mM)
0,75 µl	dNTP Mix (10 mM each)
1 µl	BabFOR (FP) (10 µM), 5' TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAT 3'
1 µl	BabREV2 (RP) (10 µM), 5' AGCCRAGACATCCAYCGCTGAAA 3'
0,25 µl	Maxima Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)
2 µl	Template DNA (60-120 ng/µl)
15,5 µl	Nukleasefreies Wasser

3.2.6 Nachweis von *Borrelia* spp.

Die Untersuchung auf Borrelien wurde aufgrund vergleichsweise häufig beschriebener Beobachtungen in Deutschland (Kapitel 2.2.2.4) in sämtlichen 2000 *D. reticulatus* Zecken einzeln durchgeführt. Dazu wurde eine Zielsequenz in der stark konservierten 5S-23S rRNA intergenic spacer region (IGS) amplifiziert. Um einen Überblick über den Infektionsgrad der Zecken zu schaffen, wurde eingangs eine konventionelle PCR verwendet. Da diese gelegentlich unspezifische Nebenbanden erzeugte, wurden Proben, die in der Gelelektrophorese Banden der gesuchten Größe bildeten, mit einer von Strube et al. (2010) entwickelten real-time PCR anschließend überprüft. Da über das erzeugte Fragment keine Differenzierung der Borrelien-Genospezies möglich war, wurden, ausgehend von den Ergebnissen der real-time PCR, positive Proben einer weiteren PCR zum Nachweis einer *hbb* Gensequenz (histon-ähnliches Protein) unterzogen (Schreiber et al. 2014), welche auf Basis der von Portnoi et al. (2006) veröffentlichten PCR entwickelt wurde.

3.2.6.1 Konventionelle PCR zur Detektion der 5S-23S rRNA intergenic spacer region

In der eingangs verwendeten konventionellen PCR wurde ein 67 bp großes Fragment der 5S-23S rRNA IGS-Sequenz untersucht. Im Verlauf der Untersuchungen wurde ein Wechsel der Polymerase vorgenommen (Sammeljahr 2010: Maxima Hot Start *Taq* DNA Polymerase, Sammeljahr 2011: Phusion Hot Start II Polymerase). Die Temperaturbedingungen für den im Jahr 2010 durchgeführten PCR-Ansatz waren wie folgt: Aktivierung der Polymerase bei 94 °C für 2 min, gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus Denaturierung (94 °C, 15 sec), Annealing (56 °C, 60 sec) und Elongation (72 °C, 45 sec). Das im Jahr 2011 verwendete Temperaturprotokoll bestand hingegen aus folgenden Schritten: Aktivierung der Polymerase bei 98 °C für 30 sec, anschließende Amplifikationsphase (50 Zyklen) bei 98 °C für 10 sec (Denaturierung), 56 °C für 30 sec (Annealing) und 72 °C für 30 sec (Elongation) sowie eine abschließende Extension bei 72 °C für 10 min. Die entsprechenden Reaktionsansätze sind für beide Jahre in Tab. 6 aufgelistet. Die verwendeten Primer, die ebenfalls in der real-time PCR genutzt wurden, sind Tab. 7 des entsprechenden Kapitels zu entnehmen. Beide Reaktionsansätze ermöglichten den Nachweis von minimal 10 Kopien. Als Positivkontrolle wurde Plasmid-DNA, die identisch zu den Vertretern des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes war, eingesetzt.

Tab. 6: Reaktionsansätze der konventionellen PCR zum Nachweis der Zielsequenz in der 5S-23S rRNA IGS-Region verschiedener Borrelien-Genospezies, modifiziert nach Strube et al. (2010)

PCR 2010 (25 µl-Ansatz)		PCR 2011 (20 µl-Ansatz)	
Volumen	Reagenz	Volumen	Reagenz
2,5 µl	10 × Maxima Hot Start <i>Taq</i> Puffer	4,0 µl	5 × Phusion HF Puffer
3,5 µl	Magnesiumchlorid (25 mM)		
3,5 µl	dNTP Mix (10 mM each)	0,4 µl	dNTP Mix (10 mM each)
0,5 µl	IGS-MGB <i>Borrelia</i> for (FP) (10 µM)	0,5 µl	IGS-MGB <i>Borrelia</i> for (FP) (10 µM)
0,5 µl	IGS-MGB <i>Borrelia</i> rev (RP) (10 µM)	0,5 µl	IGS-MGB <i>Borrelia</i> rev (RP) (10 µM)
0,2 µl	Maxima Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	Phusion Hot Start II Polymerase (2 U/µl)
1 µl	Template DNA (60-120 ng/µl)	1 µl	Template DNA (60-120 ng/µl)
13,3 µl	Nukleasefreies Wasser	13,4 µl	Nukleasefreies Wasser

3.2.6.2 Real-time PCR zur Detektion der 5S-23S rRNA intergenic spacer region

Proben, die sich in der Gelelektrophorese im Anschluss an die konventionelle PCR zum Nachweis eines Fragmentes der 5S-23S rRNA IGS-Sequenz positiv darstellten, wurden mittels real-time PCR im CFX96 Real-Time System (BIORAD) auf dasselbe Gen

Material und Methoden

nachuntersucht. Im Unterschied zur konventionellen PCR wird bei diesem Verfahren die gebildete DNA-Menge direkt gemessen, sodass eine sofortige Auswertung der Ergebnisse möglich ist. Die Messung der DNA erfolgt über die Detektion eines Fluoreszenzsignals, das hier durch Zugabe einer spezifisch bindenden Hybridisierungssonde erzeugt wird. Die verwendete Sonde gehört der Gruppe der Taqman Minor Groove Binder-Sonden an, die dadurch gekennzeichnet sind, dass das Oligonukleotid am 5'-Ende den Reporterfluoreszenzfarbstoff FAM (Fluorescein) und am 3'-Ende einen nicht fluoreszierenden Quencher trägt. Das Prinzip der Sonde beruht darauf, dass das Fluoreszenzsignal des Fluoresceins bei intakter gebundener Sonde durch den Quencher unterdrückt wird. Durch die 5'→3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase wird die Sonde während der Doppelstrangsynthese abgebaut. Der Quencher verliert seinen inhibitorischen Effekt auf den Reporter, dessen Fluoreszenzsignal nun am Ende jedes Zyklus gemessen wird. Darüber hinaus besitzt die verwendete Sonde am 3'-Ende einen Minor Groove Binder, der nach Anheftung der Sonde die Bildung äußerst stabiler Sonden-DNA-Hybride ermöglicht, indem er in die kleine Furche des neu entstandenen Doppelstrangs bindet. Dadurch wird der Einsatz von kurzen Sonden ermöglicht, welche zu einer besseren Messung der Reporterfluoreszenz und einer erhöhten Spezifität führen.

In der Studie wurden alle Proben im Doppelansatz untersucht. Als Positivkontrolle wurden ebenfalls 10 Kopien der Plasmid-DNA von Vertretern des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes eingesetzt. Die verwendeten Primer entsprechen denen der konventionellen PCR und sind zusammen mit den übrigen Reaktionskomponenten des 25 µl Ansatzes der real-time PCR in Tab. 7 aufgeführt. Das Temperaturprotokoll bestand aus der Aktivierung der Polymerase bei 95 °C für 5 min sowie aus 40 Zyklen der Denaturierung (94 °C, 20 sec), des Annealings (56 °C, 60 sec) und der Elongation (72 °C, 45 sec).

Tab. 7: Reaktionsansatz der real-time PCR zum Nachweis des 5S-23S rRNA IGS-Fragmentes verschiedener Borrelien-Genospezies, modifiziert nach Strube et al. (2010)

Volumen	Reagenz
12,5 µl	MaximaProbe qPCR Mastermix
0,5 µl	IGS-MGB Borrelia for (FP) (10 µM), 5' TCCTAGGCATTACCATAGACT 3'
0,5 µl	IGS-MGB Borrelia rev (RP) (10 µM), 5' TGGCAAATAGAGATGGAAGAT 3'
0,25 µl	IGS-MGB Borrelia Sonde 6-FAM-ATTACTTTGACCATATTT-MGBNFQ
1 µl	Template DNA (60-120 ng/µl)
10,25 µl	Nukleasefreies Wasser

3.2.6.3 Konventionelle PCR zum Nachweis einer Sequenz im *hbb* Gen

Mithilfe der konventionellen PCR zum Nachweis einer Sequenz im *hbb* Gen wurde die Genospeziesbestimmung bei den zuvor positiv getesteten Proben vorgenommen. Die PCR basierte auf der Veröffentlichung von Portnoï et al. (2006), wurde am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin jedoch modifiziert (Schreiber et al. 2014). Der entsprechende 20 µl Reaktionsansatz ist Tab. 8 zu entnehmen. Die verwendeten Primer amplifizierten eine 153 bp lange Zielsequenz, die die notwendigen Basenunterschiede zur Differenzierung wichtiger Vertreter des sensu lato-Komplexes (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi s.s.*, *B. valaisiana*, *B. spielmanii*) sowie von einigen Vertretern der Rückfallfieber-Gruppe (z. B. *B. miyamotoi*) aufwies. Das Temperaturprotokoll sah folgende Schritte vor: nach einer anfänglichen Aktivierung der Polymerase bei 98 °C für 30 sec folgte die Amplifikationsphase (40 Zyklen) bei 98 °C für 5 sec (Denaturierung), 57 °C für 30 sec (Annealing) und 72 °C für 10 sec (Elongation). Abschließend wurde die finale Extension bei 72 °C für 5 min durchgeführt. Mit einer Nachweisrate von 5 Kopien der Positivkontrolle war diese PCR äußerst sensitiv.

Tab. 8: Reaktionsansatz zum Nachweis der *hbb* Gensequenz der Borrelien-Genospezies

Volumen	Reagenz
4 µl	5 × Phusion HF Puffer
0,4 µl	dNTP Mix (10 mM each)
1 µl	hbb640 (FP) (10 µM), 5' GTAAGGAAATTAGTTTATGTCTTT 3'
1 µl	hbb Bw (RP) (10 µM), 5' TAAGCTCTTCAAAAAAAGCATCTA 3'
0,2 µl	Phusion Hot Start II Polymerase (2 U/µl)
1 µl	Template DNA (60-120 ng/µl)
12,4 µl	Nukleasefreies Wasser

3.2.7 Nachweis von *Anaplasma* und *Ehrlichia* spp. sowie *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*

3.2.7.1 Konventionelle PCR zur Detektion einer Sequenz im 16S rRNA Gen

Der Nachweis von Vertretern der Anaplasmen und Ehrlichien bzw. von *Cand. Neoehrlichia mikurensis* wurde in *D. reticulatus* bislang nur vereinzelt in der Literatur beschrieben (Kapitel 2.2.3-2.2.5). Dementsprechend erfolgte die Untersuchung der Zecken in Form von Pools, deren Zusammenstellung schon in Kapitel 3.2.5 erläutert wurde. Zu Beginn der Studie lag der Fokus auf der Untersuchung von Anaplasmen und Ehrlichien, sodass die folgenden

Material und Methoden

Beschreibungen zur Etablierung der PCR ausschließlich auf den Nachweis dieser beiden Gattungen beruhen. Im Rahmen anderer in der Arbeitsgruppe durchgeführter Versuche wurde erst im Verlauf der Studie deutlich, dass dieser Assay auch zur Vervielfältigung einer Gensequenz des bis dahin weitestgehend unbekanntes Erregers *Cand. Neoehrlichia mikurensis* führte und somit das Nachweisspektrum erweiterte.

Als Ausgangspunkt wurde ein bereits publiziertes Primerpaar verwendet, welches den Nachweis verschiedener Vertreter der Gattungen *Anaplasma* und *Ehrlichia* mithilfe einer gemeinsamen PCR ermöglichte (Tabar et al. 2009). Zur Detektion einer größeren Vielfalt von Erregern innerhalb dieser Gattungen wurde der Vorwärtsprimer durch Einbau eines Wobbles geringgradig modifiziert (Tab. 9) und die Reaktionsbedingungen des Assays, wie schon in Kapitel 3.2.5.2 beschrieben, angepasst. Die modifizierte PCR wurde bereits angewandt und in Krücken et al. (2013) publiziert. Die Erstellung eines Alignments mithilfe Clone Manager Professional 9 bzw. Mega 7 verdeutlichte die Kompatibilität der Primer zu den nachfolgenden, im Fokus stehenden Spezies, welche bereits im Menschen und in domestizierten Tieren in Europa beschrieben wurden: *A. phagocytophilum* (GenBank Zugangsnummer AY055469.3), *A. marginale* (AF311303), *A. platys* (EF139459.1), *A. bovis* (AB211163.1), *E. canis* (AF162860), *A. centrale* (AF318944.1) und *A. ovis* (AY262124.1). Über diesen Rahmen hinaus deckt das Primerpaar die Sequenzen von *E. ruminantium* (NR_074513.1), *E. chaffeensis* (M73222.1), *E. muris* (AB196302.1) und *E. ewingii* (NR_044747.1) ab. Letztere Vertreter wurden bislang nicht in Europa oder in domestizierten Tieren beschrieben. Nahezu alle Spezies konnten anhand des 257 bp großen Fragmentes differenziert werden. Jeweils 100%ig identische Sequenzen wurden lediglich zwischen *A. phagocytophilum*/*A. platys*, *A. marginale*/*A. centrale*/*A. ovis* bzw. *E. chaffeensis*/*E. muris* erzeugt. Weiterhin wurde die Sensitivität der modifizierten PCR im Vorfeld der eigentlichen Untersuchungen überprüft. Dazu wurden einzelne zuvor als negativ bestimmte Zecken aus den Jahren 2010 und 2011 in Einzel- und Poolform in ähnlicher Weise wie bereits in Kapitel 3.2.5.2 beschrieben mit Plasmid-DNA von *A. phagocytophilum* (10, 20, 50, 100 und 200 Kopien) versetzt und das Detektionsminimum bestimmt. Mit einer Nachweisgrenze von 20 Kopien agierte die PCR sehr sensitiv. Eine Zusammenfassung des 25 µl Reaktionsansatzes ist in Tab. 9 aufgeführt. Die Temperaturbedingungen sahen die Aktivierung der Polymerase bei 95 °C für 5 min, 40 Zyklen bestehend aus Denaturierung (94 °C, 15 sec), Annealing (60 °C, 30 sec) und Elongation (72 °C, 30 sec) sowie eine abschließende finale Extension bei 72 °C für 7 min vor. Bei jeder PCR wurde Plasmid-DNA von *A. phagocytophilum* (20 Kopien) als Positivkontrolle eingesetzt.

Material und Methoden

Tab. 9: Reaktionsansatz zum Nachweis der 16S rRNA Gensequenz verschiedener Anaplasmatataceae

Volumen	Reagenz
2,5 µl	10 × Maxima Hot Start <i>Taq</i> Puffer
1,5 µl	Magnesiumchlorid (25 mM)
0,75 µl	dNTP Mix (10 mM each)
0,75 µl	E+Afor (FP) (10 µM), 5' GGGGATGATGTCAARTCAGCAY 3'
0,75 µl	E+Arev (RP) (10 µM), 5' CACCAGCTTCGAGTTAAGCCAAT 3'
0,25 µl	Maxima Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)
1 µl	Template DNA (60-120 ng/µl)
17,5 µl	Nukleasefreies Wasser

3.2.7.2 High Resolution Melt Analysis zur Detektion der 16S rRNA Gensequenz

Zeitgleich zu dieser Untersuchung übernahmen weitere am Institut durchgeführte Studien die PCR zum Nachweis der 16S rRNA Gensequenz. Dabei wurde in *I. ricinus* und verschiedenen Nagetierspezies auch *Cand. Neoehrlichia mikurensis* nachgewiesen, woraufhin das Verfahren der High Resolution Melt (HRM) am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin etabliert wurde (Krücken et al. 2013). Die Methode, welche eine Differenzierung von *A. phagocytophilum*, *Cand. Neoehrlichia mikurensis* und *E. canis* erlaubte, basierte auf der Detektion desselben Fragmentes und war ausgesprochen zeit- und kosteneffizient. Der Untersuchung wurden ausschließlich Proben unterzogen, die nach Durchführung der konventionellen PCR in der Gelelektrophorese Banden der gesuchten Größe erzeugten.

Bei der HRM wurde das Template zunächst mittels real-time PCR im CFX96 Real-Time System (BIORAD) amplifiziert. Mit Ausnahme der Erhöhung der Anzahl der Zyklen auf 50 entsprach der Temperaturverlauf dem der konventionellen PCR (Kapitel 3.2.7.1). Das gewonnene Material wurde anschließend durch schrittweise Erhöhung der Temperatur von 72 °C auf 95 °C (0,6 °C/min) in seine Einzelstränge aufgespalten. Dadurch wurde der zuvor an die Doppelstränge interkalierende Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen frei und die Stärke des Fluoreszenzsignals nahm ab. EvaGreen ist ein Farbstoff, der in der PCR in solchen Konzentrationen eingesetzt werden kann, dass alle Bindungsstellen gesättigt sind. Daher bindet es während der Schmelzphase nicht erneut an noch vorhandene Doppelstrangmoleküle und beugt einer Verfälschung der Schmelzwerte vor. Die Verringerung des Fluoreszenzsignals ist an das auf der Basenabfolge beruhende unterschiedliche Schmelzverhalten der DNA der verschiedenen Erreger gekoppelt und ermöglichte dadurch die Speziesdifferenzierung. So ist beispielsweise das DNA-Fragment von *Cand. Neoehrlichia mikurensis* durch den geringeren Gehalt an Cytosin und Guanin

Material und Methoden

vergleichsweise instabil und wird bereits bei niedrigeren Temperaturen aufgespalten. Krücken et al. (2013) beschreiben weiterhin, dass die Schmelztemperatur auch bei Koinfektionen durch eine mögliche Bildung von vergleichsweise instabilen Heteroduplexen erniedrigt sei. Im Anschluss an die Reaktion wurden die Ergebnisse mithilfe der Software Precision Melt Analysis ausgewertet.

Der 25 µl Reaktionsansatz für die HRM ist in Tab. 10 aufgeführt. Die verwendeten Primer entsprechen denen der konventionellen PCR. Jeweils 100 Kopien von *A. phagocytophilum* und *Cand. Neoehrlichia mikurensis* wurden als Positivkontrollen mitgeführt.

Tab. 10: Reaktionsansatz zur Schmelzkurvenanalyse von *A. phagocytophilum* und *Cand. Neoehrlichia mikurensis* anhand des 16S rRNA Gens

Volumen	Reagenz
5,0 µl	5 × Phusion HF Puffer
0,75 µl	dNTP Mix (10 mM each)
0,75 µl	E+Afor (FP) (10 µM), 5' GGGGATGATGTCAARTCAGCAY 3'
0,75 µl	E+Arev (RP) (10 µM), 5' CACCAGCTTCGAGTTAAGCCAAT 3'
0,25 µl	Phusion Hot Start II Polymerase (2 U/µl)
0,4 µl	Eva Green Fluorescent DNA Stain
1 µl	Template DNA (60-120 ng/µl)
16,1 µl	Nukleasefreies Wasser

3.2.8 Konventionelle PCR zum Nachweis von *Rickettsia* spp. mittels *gltA*-Gen

Bisherige Veröffentlichungen deuteten auf eine hohe Prävalenz von Rickettsien in *D. reticulatus* hin (Kapitel 2.2.6.3). Aus diesem Grund wurden alle 2000 Zecken einzeln untersucht. Zur Bestimmung der Rickettsien-Prävalenz wurde zunächst eine 203 bp große Zielsequenz des *gltA* Gens (Citratsynthase codierendes Gen) amplifiziert. Im Anschluss daran wurde eine Stichprobe positiv getesteter Zecken mit einer zweiten konventionellen PCR untersucht, die ein 676 bp großes Fragment im selben Gen vervielfältigte. Diese PCR agierte weniger sensitiv als der vorangegangene Assay, welcher eine Nachweisgrenze von 5 Kopien aufwies. Dahingegen ermöglichte die 676 bp PCR die Differenzierung verschiedener Rickettsien-Genospezies innerhalb der spotted fever group und typhus group. Die Detektionsuntergrenze lag bei 50 Kopien. Beide PCR-Assays wurden am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin etabliert (Schreiber et al. 2014). Die verwendeten Primer und Reaktionsansätze beider PCR-Verfahren sind in Tab. 11 und Tab. 12 aufgelistet.

Material und Methoden

Das Temperaturprotokoll der 203 bp PCR umfasste die Aktivierung der Polymerase bei 98 °C für 30 sec, die Amplifikationsphase (50 Zyklen) bei 98 °C für 10 sec (Denaturierung), 52 °C für 30 sec (Annealing) und 72 °C für 15 sec (Elongation) sowie die finale Extension bei 72 °C für 5 min. Bei der 676 bp PCR wurde die Polymerase zunächst bei 95 °C für 4 min aktiviert. Über 50 Zyklen hinweg erfolgten anschließend Denaturierung (95 °C, 15 sec), Annealing (53 °C, 30 sec) und Elongation (72 °C, 40 sec). Abschließend wurde die finale Extension bei 72 °C für 10 min durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid von *R. helvetica* eingesetzt.

Tab. 11: Primer zur Vervielfältigung der Fragmente im *gltA* Gen von *Rickettsia* spp.

Primer	Fragment	Sequenz (5'-3')	Länge (nt)
RmasgltA863up (FP)	203 bp	GCTAAAGCTAAGGATAAAAATGAT	24
CS409d (FP)	676 bp	CCTATGGCTATTATGCTTGC	20
RmasgltA1065lo (RP)	Beide	TCAATAAAATATTCATCTTTAAGAGC	26

Tab. 12: Reaktionsansätze zum Nachweis der Fragmente im *gltA* Gen von *Rickettsia* spp.

203 bp PCR (25 µl-Ansatz)		676 bp PCR (25 µl-Ansatz)	
Volumen	Reagenz	Volumen	Reagenz
5,0 µl	5 × Phusion HF Puffer	2,5 µl	10 × Maxima Hot Start <i>Taq</i> Puffer
		1,5 µl	Magnesiumchlorid (25 mM)
0,5 µl	dNTP Mix (10 mM each)	0,5 µl	dNTP Mix (10 mM each)
1,25 µl	RmasgltA863up (FP) (10 µM)	1,25 µl	CS409d (FP) (10 µM)
1,25 µl	RmasgltA1065lo (RP) (10 µM)	1,25 µl	RmasgltA1065lo (RP) (10 µM)
0,25 µl	Phusion Hot Start II Polymerase (2 U/µl)	0,2 µl	Maxima Hot Start <i>Taq</i> DNA Polym. (5U/µl)
1 µl	Template DNA (60-120 ng/µl)	1 µl	Template DNA (60-120 ng/µl)
16,25 µl	Nukleasefreies Wasser	16,8 µl	Nukleasefreies Wasser

3.2.9 Gelelektrophorese

Nach jedem Durchlauf einer konventionellen PCR wurde zur Auswertung der vervielfältigten Proben eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente mithilfe eines elektrischen Feldes durch ein Gitternetz von Agarosefasern zur Anode. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe passieren kleinere Moleküle das Netzwerk schneller als Größere. In Abhängigkeit von der Größe der gesuchten DNA-Fragmente wurden unterschiedlich konzentrierte Gele verwendet. Orientierung bietet die Auflistung von Sambrook und Russel (2000). Mit Ausnahme der 67 bp großen Zielsequenz

der Borrelia-PCR, welche in einem 2,5%igem Gel analysiert wurde, wurden sämtliche verbleibenden Proben in einem 1,5%igem Gel überprüft. Zur Herstellung entsprechender Gele wurde Agarose zusammen mit TAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht. Das auf 65 °C heruntergekühlte Agarosegel wurde mit GRGreen versetzt (1 µl/10 ml Gel), zum Aushärten in einen Schlitten mit eingesetztem Kamm gegossen und schließlich in eine mit TAE-Puffer befüllte Gelelektrophoresekammer überführt. Im Anschluss wurde jede Probe mit einem 6 × Ladungspuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Neben den zu untersuchenden Proben wurden zur Kontrolle der PCR die Negativ- und Positivkontrollen aufgetragen. Zudem wurde ein an die Größe des gesuchten Fragmentes angepasster Größenstandard mitgeführt (50 bis 100 bp Marker). Von jedem Marker wurden 5 µl (125 ng) in die Taschen pipettiert. Die Fragmente wurden je nach Konzentration des Gels in einem Bereich von 80-110 V aufgetrennt. Die Sichtbarmachung der Banden positiver Proben erfolgte anschließend auf dem UV-Tisch in der G:Box (SYNGENE) mithilfe der GeneSnap Version 7.09.06 Software.

3.2.10 Identifizierung der Erregerspezies

Die Durchführung der verschiedenen PCR-Verfahren und deren anschließende Auswertung mittels Gelelektrophorese ließen Aussagen über die Anzahl infizierter Zecken mit den jeweiligen Erregergattungen zu. Eine abschließende Bestätigung und Zuordnung des amplifizierten Materials zu der entsprechenden Erregerspezies war jedoch nur über die Sequenzierung der erhaltenen Produkte möglich. In Vorbereitung der Sequenzierung musste die amplifizierte DNA zunächst aufgereinigt werden, um überschüssige Salze, Primer und Polymerasen zu entfernen.

3.2.10.1 Aufreinigung der DNA-Proben mittels Gel-Extraktion und Fällung

Die Extraktion des Amplifikats aus dem Gel mit anschließender Fällung und Reinigung stellte eine einfache und vergleichsweise preiswerte Möglichkeit zur Aufreinigung der DNA dar. Die im Gel als positiv ermittelten Proben wurden erneut auf ein Gel aufgetragen, mit dem Unterschied, dass eine Proben-Menge von 12 µl mit 3 µl 6 × Ladungspuffer und 3 µl Aqua bidest versetzt wurde. Zur Extraktion wurden die Banden der einzelnen Proben mit einer separaten Skalpellklinge aus dem Gel herausgeschnitten und auf den Filter einer 1000 µl Pipettenspitze, die in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß steckte, überführt. Im anschließenden Zentrifugationsschritt (10 min, 11000 × g) passierte die DNA zusammen mit flüssigen Bestandteilen des Gels die Membran und wurde so vom Gelblock getrennt. Die Menge der erhaltenen Flüssigkeit wurde mithilfe einer Pipette gemessen. Zur Fällung der DNA wurde

1 µl Glycogen zugesetzt. Des Weiteren wurden 3 M Natriumacetat (pH 5,5) im Verhältnis 1:10 zur Ausgangsmenge der gemessenen Flüssigkeit und 100%iges Isopropanol (bei -20 °C gekühlt) im Verhältnis 1:1 zugegeben und mehrmals geschwenkt. Der Ansatz wurde über Nacht bei -20 °C gelagert. Am Folgetag wurden die Proben zur Trennung der gefällten DNA von den übrigen Bestandteilen zunächst in der Kühlzentrifuge bei 4 °C und 20817 × g für 45 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, 1 ml 75%iges gekühltes Ethanol dem Pellet zur Waschung zugesetzt und auf dem Vortexer gemischt. Die Proben wurden ein weiteres Mal bei 4 °C und 20817 × g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Wahlweise wurde die Ethanolwaschung ein zweites Mal durchgeführt. Das Pellet wurde ausgiebig getrocknet, um letzte Ethanolreste zu entfernen. Im letzten Schritt wurde das aufgereinigte DNA-Pellet in 25 µl nukleasefreiem Wasser gelöst.

3.2.10.2 Aufreinigung mittels High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE)

Die Aufreinigung der DNA mithilfe des High Pure PCR Product Purification Kits von der Firma ROCHE basiert auf dem Säulenprinzip und stellt ein zeitlich effektives Verfahren dar. Die DNA konnte im Vorfeld auf ein Gel aufgetragen und ausgeschnitten werden oder aber das PCR-Produkt wurde direkt mit dem ROCHE Kit verarbeitet. Voraussetzung für die letztgenannte Methode war, dass neben dem gesuchten Fragment keine weiteren Banden in der PCR erzeugt wurden. Für die Aufreinigung wurde das Material auf die High Pure Filter Säulen überführt und die an die Membran gebundene DNA durch den Einsatz verschiedener Waschpuffer von Kontaminanten befreit. Alle Reaktionsschritte wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Lediglich die Elution der DNA erfolgte mit 50 µl erwärmten (65 °C) nukleasefreiem Wasser anstelle des mitgelieferten Elutionspuffers.

3.2.10.3 Sequenzierung

Die aufgereinigte DNA wurde zur Sequenzierung an ein externes Unternehmen (GATC Biotech, Konstanz oder LGC Genomics, Berlin) geschickt. In diesem Verfahren wird die Basenabfolge der Sequenz jeder Probe analysiert, wodurch eine Genospeziesidentifizierung ermöglicht wird.

Um die für die Sequenzierung geforderte Menge und Konzentration an Nukleinsäuren zu gewährleisten, wurden im Vorfeld sämtliche aufgereinigte Amplifikate in der Gelelektrophorese überprüft. Die als Größen- und Mengenstandard mitgeführte λ Phagen DNA (restringiert mit *EcoRI* und *HindIII*; 5 µl, 125 ng) erlaubte Aussagen über die Konzentration der vorhandenen Banden. Zur besseren Auftrennung der Banden des Markers wurde dieser zunächst bei 65 °C für 5 min erhitzt und anschließend 3 min auf Eis herunter

gekühlt. Die Amplifikate (1 µl) wurden mit 9 µl Aqua bidest und 2 µl 6 × Ladungspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Bei ausreichender Quantität der Proben wurden diese zusammen mit einem Aliquot des spezifischen Primers entsprechend den Vorgaben der Sequenzierungsfirmen vorbereitet und verschickt.

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit der Software Clone Manager Professional 9 bearbeitet und die Spezies mithilfe der NCBI-Datenbank ermittelt.

3.2.11 Datenberechnungen

3.2.11.1 Grundlagen: Normierung der Fangdaten

Zwischen den Jahren sowie den einzelnen Standorten entstanden im Laufe der Studie Differenzen in Bezug auf die Gesamtfangdauer bzw. der Anzahl der durchgeführten Fangtermine. Auch konnte die angestrebte Fangzeit von einer Stunde nicht an jedem Termin eingehalten werden. Ein anzuführender Grund war der unterschiedliche Beginn der Probennahmen zwischen den Jahren. Während 2011 schon mit Jahresbeginn geflaggt wurde, wurde 2010 aufgrund des Studienbeginns erst Ende März/Anfang April begonnen. Als weitere Ursache sind schlechte Wetterbedingungen, die zum Verschieben eines Fangtermins bzw. zum frühzeitigen Abbruch der Probennahme führten, zu nennen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten wurden die Fangwerte der Zecken an den vereinzelt Tagen, an denen keine volle Stunde geflaggt wurde, auf die zu erwartende Anzahl bei einer Fangdauer von 1 Stunde extrapoliert und bei Analysen von Zählwerten gerundet. Für vergleichende zeitliche und räumliche Beschreibungen wurde der Durchschnitt der gefangenen Zecken/h aus allen Fangterminen errechnet.

3.2.11.2 Statistische Berechnungen

Sämtliche Daten wurden zunächst tabellarisch in Microsoft Excel erfasst. Die Berechnung und Darstellung statistischer Zusammenhänge erfolgte mit RStatistics (Version 3.3.2) und RStudio (Version 0.99.903).

Berechnungen zu den Zeckenfangzahlen

Anteilsberechnungen in Bezug auf verschiedene Zeckenspezies oder -geschlechter sowie deren 95 % Konfidenzintervalle (als Wilson Score Intervalle) wurden unter Verwendung der „propCI“-Funktion im Paket „prevalence“ in der R-Software durchgeführt. Um signifikante Unterschiede unter ihnen zu bestimmen, wurde mithilfe eines Binomial-Tests im Rahmen der „chisq.test“-Funktion geprüft, inwieweit die Anteile signifikant unterschiedlich von 50 % waren. Der paarweise statistische Vergleich der Geschlechterverhältnisse innerhalb

einzelner Saisons und Jahre wurde zudem mit der Funktion „tab2by2.test“ (Mid-P Exakt Test) im Paket „epitools“ durchgeführt.

Um mögliche Einflüsse der ermittelten Variablen Standort, Jahr, Saison, Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit auf die Aktivität von *D. reticulatus* im Zusammenhang zu untersuchen, wurde mithilfe der Negativ-Binomial-Regressionsanalyse ein generalisiertes lineares Modell erstellt. Die Modellrechnung beruhte auf den normierten 1-Stunden-Werten. Da die Negativ-Binomial-Regressionsanalyse nur mit ganzzahligen Zähldaten, die stets größer als Null sind, rechnet, wurden vorhandene Zahlen mit Komastelle mit dem Befehl „round“ gerundet. Außerdem flossen nur die Daten aus den Jahren 2010 und 2011 in die Rechnung mit ein, da 2012 ausschließlich der Standort Güterfelde beprobt wurde. Das Grundmodell wurde mithilfe der „glm.nb“-Funktion im Paket „MASS“ erstellt und anschließend unter Verwendung verschiedener Funktionen verbessert. Die Verbesserung beinhaltete die Identifizierung der für das Modell nicht relevanten Variablen und wurde mithilfe des AICs (Akaike Informationskriterium) bzw. des Wald-Tests vorgenommen. Das AIC gibt die Anpassungsgüte des Modells an. Durch Verwendung der „drop1“-Funktion wurden schrittweise Variablen entfernt, welche die deutlichste Verbesserung des AICs nach Entnahme aus dem Modell bewirkten. Dies wurde solange durchgeführt, bis keine Verbesserung des AICs mehr herbeigeführt werden konnte. Zusätzlich wurde für jede kategoriale Variable der generelle Einfluss mittels Wald-Test berechnet. Dazu wurde die Funktion „wald.test“ im Paket „aod“ genutzt. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Level dieser Variablen wurden hingegen durch einen in der Modellberechnung integrierten t-Test ermittelt. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant erachtet. Die 95 % Konfidenzintervalle der Variablen wurden mithilfe der „confint“-Funktion berechnet. Zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Level einer Variable wurden die Rate Ratios und die dazugehörigen 95 % Konfidenzintervalle durch Exponieren („exp“) der im Modell errechneten Schätzwerte ermittelt.

Abschließend wurde die Güte des besten Modells ermittelt. Dazu wurde das Modell mittels Likelihood-Ratio-Test („lrtest“-Funktion, Paket „lmodel2“) gegen das Nullmodell (nur Intercept), Grundmodell und gegen ein entsprechendes Poisson-Modell getestet. Darüber hinaus wurden als Korrelationsmaße die Pseudo- R^2 Berechnungen nach McFadden und nach Nagelkerke herangezogen („pR2“-Funktion, Paket „pscl“), welche beide einen Wert zwischen „0“ und „1“ annehmen können. Je dichter das Pseudo- R^2 an „1“ grenzt, desto mehr der Variabilität der abhängigen Variable wird durch die erklärenden Variablen definiert.

Berechnungen zu den Erregerprävalenzen

Die Prävalenzen der verschiedenen Erreger mit den dazugehörigen Konfidenzintervallen wurden ebenfalls als Wilson Score Intervalle mit der „propCI“-Funktion im Paket „prevalence“

berechnet. Der Vergleich der ermittelten Infektionsraten wurde zunächst einzeln nach Standort, Jahr und Saison durchgeführt. Der paarweise statistische Vergleich innerhalb dieser Parameter wurde mit dem Mid-P Exakt Test mithilfe der Funktion „tab2by2.test“ im Paket „epitools“ durchgeführt. Die in diesem Zusammenhang z. T. erforderliche p-Wert Korrektur nach Holm wurde durch die „p.adjust“-Funktion vorgenommen. Auch hier galt ein p-Wert von $p < 0,05$ als signifikant.

Um den Einfluss der Parameter Standort, Jahr und Saison auf die Infektionsrate der Zecken im Zusammenhang zu betrachten, wurde anschließend eine logistische Regression durchgeführt. Unabhängig von der für die Wahl der zu untersuchenden Proben unternommene Teilung des Kalenderjahres in zwei Jahreshälften, wurden in der Modellrechnung für den Parameter Saisonalität weiterhin die vier Jahreszeiten herangezogen, wie sie auch bei Betrachtung der Zeckenaktivität verwendet wurden. Das Modell wurde mit der „glm“-Funktion in der R-Software erstellt. Die Variablenselektion und die Beurteilung der Modellgüte wurden in gleicher Weise durchgeführt, wie schon unter dem Abschnitt „Berechnungen zu den Zeckenfangzahlen“ beschrieben. Lediglich der Vergleich des Schlussmodells zu einem Poisson-Modell war unter diesem Gesichtspunkt nicht erforderlich. Die Berechnung der 95 % Konfidenzintervalle erfolgte mithilfe der Funktion „confint“. Durch Exponieren der im Modell erhaltenen Schätzwerte der relevanten Variablen wurden die Odds Ratios errechnet, welche die Wahrscheinlichkeit infizierte Zecken in Abhängigkeit von der Ausprägung der jeweiligen Variable zu finden, wiedergeben.

4 Ergebnisse

4.1 *Dermacentor reticulatus*

4.1.1 Überblick zu den Fangzahlen

In den Jahren 2010 bis 2012 wurde an allen vier Standorten eine Gesamtanzahl von 9186 wirtssuchenden *D. reticulatus* und *I. ricinus* Zecken geflaggt. In dem Zeitraum März/April bis November 2010 kamen in einer Fangzeit von 3410 min 3734 Zecken zusammen. Dahingegen wurden im Zeitraum Januar bis November 2011 eine Gesamtfangzeit von 5000 min und eine Gesamtanzahl von 5150 geflaggt Zecken dokumentiert. Bei der zusätzlichen Beprobung des Standortes Güterfelde im Winter und Frühjahr 2011/2012 kamen innerhalb von 390 min weitere 302 Exemplare hinzu.

Diese zwischen den Jahren entstandenen Variabilitäten in der Fangdauer, aber auch in der Fangfrequenz, waren ebenfalls zwischen den Standorten nicht zu vermeiden (Tab. 13). Während 2011 die Fanghäufigkeit an den Standorten mit 21 Terminen identisch war, variierte die Anzahl 2010 zwischen 14 und 16 individuellen Terminen. Ursachen dafür lagen zum einen im Studienaufbau (unterschiedlicher Sammelbeginn pro Jahr), zum anderen schränkten teils schlechte Witterungsbedingungen die Probennahmen ein.

Tab. 13: Überblick zur absoluten Anzahl gesammelter Buntzecken sowie Angabe der Anzahl der Fangtermine und der Gesamtfangdauer pro Jahr. n.d. = nicht untersucht

	Güterfelde	Gatow	Falkenberg	K. Wusterh.
	Absolute Anzahl gefangener Zecken			
	Anzahl Fangtermine/Gesamtfangdauer			
2010	906	1214	400	656
(Mrz-Nov)	16/975 min	14/840 min	14/755 min	14/840 min
2011	1359	1928	629	777
(Jan-Nov)	21/1230 min	21/1270 min	21/1250 min	21/1250 min
2011/12	297	n.d.	n.d.	n.d.
(Dez-Apr)	7/390 min	0	0	0

Zum besseren Vergleich der Zeckenaktivität zwischen räumlichen und zeitlichen Faktoren wird in den folgenden Ausführungen die Anzahl gefangener Zecken/h verwendet. An 8 von 149 Fangterminen wich die Probennahmedauer von der angestrebten Zeit von 1 Stunde (minimal 20 min bis maximal 75 min) ab, sodass die Zeckenzahlen an diesen Tagen entsprechend dieser Fangdauer extrapoliert wurden (Kapitel 3.2.11.1). Lediglich die

Ergebnisse

Geschlechter- und Speziesvergleiche in Kapitel 4.1.3 und 4.1.5 basieren auf den nicht-normierten Zahlen. Detaillierte Angaben zu den absoluten Daten in Bezug auf die Zeckenanzahl und die Fangdauer sind für sämtliche Sammeltermine in Tab. 24 bis Tab. 27 im Anhang aufgelistet.

Der Gesamtzeckenfang umfasste die beiden Zeckenspezies *D. reticulatus* und *I. ricinus* (nähere Informationen siehe Kapitel 4.1.5). Mit 8166 gesammelten Exemplaren stellte *D. reticulatus* den dominierenden Anteil dar und verdeutlichte somit die Charakteristik der Fangorte als Buntzeckenhabitats. Auf Basis der normierten 1-Stunden-Daten gibt Tab. 14 einen Überblick über die Funde von *D. reticulatus* in Abhängigkeit von Standort und Jahr.

Tab. 14: Angabe der durchschnittlichen Fangzahlen (\bar{x}) adulter *D. reticulatus*/h sowie der minimalen (Min) und maximalen (Max) Fangwerte/h getrennt nach Standort, Jahr und Saison. Die Werte basieren auf den normierten Daten (Kapitel 3.2.11.1). n = Anzahl Fangtermine, n.d. = nicht untersucht

	Güterfelde			Gatow			Falkenberg			K. Wusterh.		
	\bar{x}	Min-Max	n	\bar{x}	Min-Max	n	\bar{x}	Min-Max	n	\bar{x}	Min-Max	n
Jahr 2010												
Frühjahr	17,08	1-37	5	46,7	19-63	3	11,3	2-28	3	22,3	8-35	3
Sommer	0,4	0-1	5	0,8	0-2	5	0,2	0-1	5	0,25	0-1	4
Herbst	135,3	21-254	6	178,3	40-270	6	70	6-96	6	84	1-156	7
Gesamt	56,2	0-254	16	86,7	0-270	14	32,5	0-96	14	46,9	0-156	14
Jahr 2011												
Winter	50,3	0-101	3	130,5	79-182	2	27,5	3-52	2	36,5	2-71	2
Frühjahr	74,2	10-166	6	89	19-162	7	31,3	1-70	6	62,7	5-114	6
Sommer	0,2	0-1	5	0,4	0-2	5	0	0-0	6	0,6	0-2	5
Herbst	108,9	27-183	7	142,4	29-270	7	55,5	24-82	7	41	13-61	8
Gesamt	64,7	0-183	21	89,7	0-270	21	30,1	0-82	21	37,1	0-114	21
Jahr 2012												
Winter	18,8	2-42	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Frühjahr	81	58-121	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Gesamt	45,4	2-121	7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Ergebnisse

4.1.2 Saisonales Aktivitätsmuster adulter *Dermacentor reticulatus*

Anhand der Fangdaten war im Verlauf eines Jahres ein ausgeprägtes bimodales Auftreten adulter *D. reticulatus* ersichtlich. Die entsprechenden Aktivitätsverläufe sind für alle vier Standorte der Abb. 4 zu entnehmen.

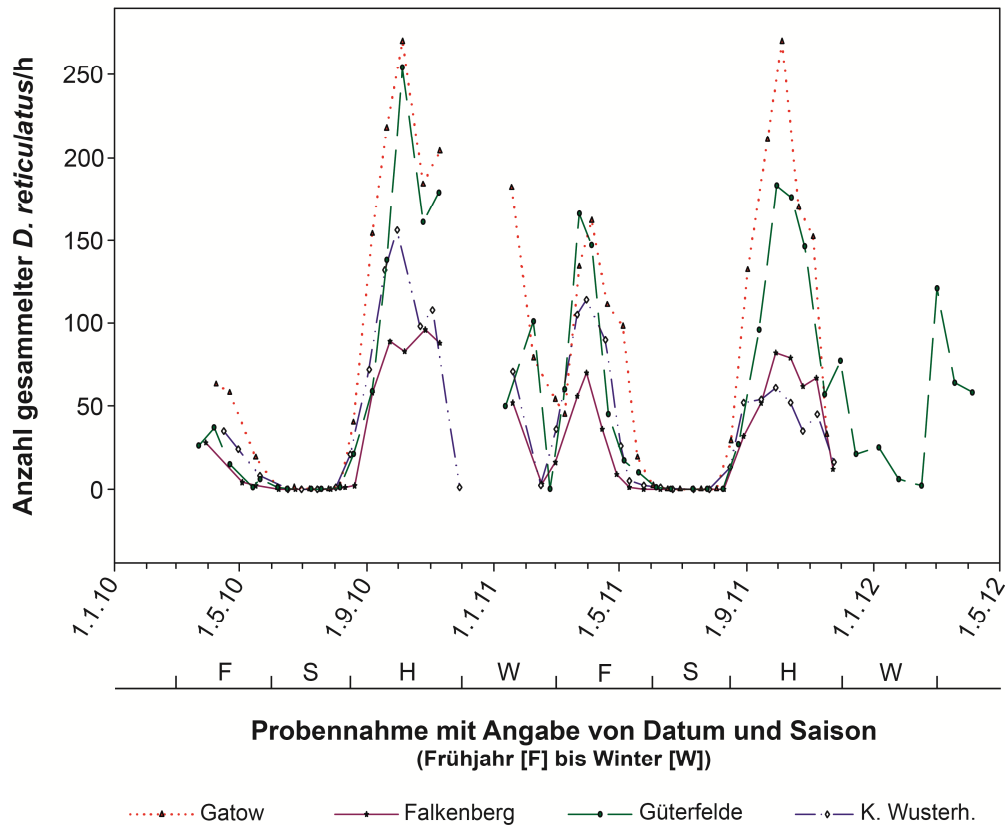


Abb. 4: Im Jahresverlauf auftretende Aktivitäten von *D. reticulatus* an den untersuchten Standorten Güterfelde, Gatow, Falkenberg und K. Wusterh. im Zeitraum 2010 bis 2011 bzw. 2012 (Güterfelde)

Die Rohdaten (Tab. 24 bis Tab. 27, Anhang) verdeutlichen dieses charakteristische Zeckenaufkommen sowohl für Weibchen als auch für Männchen. Generell war das Vorkommen der Buntzecken durch einen Anstieg während der Frühjahrs- und Herbstmonate und einem Ruhen während der Sommermonate gekennzeichnet. Eine erste stabile Aktivitätsphase erstreckte sich von März bis Mitte/Ende Mai (= Saison Frühjahr) mit einem Aktivitätsmaximum gegen Ende März. In Abhängigkeit vom Standort betrug die durchschnittliche Anzahl gesammelter *D. reticulatus*/h in diesem Zeitraum 11,3-46,7 (2010) bzw. 31,3-89,0 (2011) (Tab. 14). Während der Monate Juni bis Mitte August (= Saison Sommer) wurden an allen Standorten keine bis maximal 0,8 Buntzecken/h geflaggt. Im Anschluss wurde eine zweite Aktivitätsphase adulter *D. reticulatus* beobachtet, welche ihr Maximum zumeist zwischen September und Oktober fand und bis Mitte November enorm abfiel. Die durchschnittliche Zeckenzahl/h betrug in dieser Zeit (= Saison Herbst)

Ergebnisse

70-178,3 (2010) bzw. 41-142,4 (2011). Der starke Rückgang der Anzahl aktiver Zecken mit Ende November deutete auf das Ende der zweiten Aktivitätsphase hin. In den Monaten Dezember bis Februar (= Saison Winter) wurde die Probennahme aufgrund der fortwährenden winterlichen Bedingungen (2010/2011) bzw. aufgrund des Studiendesigns (2011/2012) nur eingeschränkt durchgeführt. Einzelne Probennahmen bei geeigneter Witterung (minimale Temperatur ca. 0 °C, keine geschlossene Schneedecke) wiesen auf eine mögliche Aktivität adulter Zecken in diesem Zeitraum hin, zeigten im Vergleich zu den anderen Saisons jedoch starke Schwankungen. Demnach wurde mit dem Abschmelzen der Schneedecke im Januar 2011 eine hohe Aktivität von durchschnittlich 88,8 (Spanne 50-182) Zecken/h beobachtet, die Mitte Februar jedoch wieder auf ≤ 3 Zecken/h abfiel. Auch im Winter 2011/2012 wurden an sämtlichen Terminen 2-42 *D. reticulatus*/h am zusätzlich beprobten Standort Güterfelde gesammelt.

4.1.3 Entwicklungsstadien und Geschlechterstruktur von *Dermacentor reticulatus*

Alle in dem Studienzeitraum gesammelten Buntzecken wurden als adulte Zecken identifiziert. Auf der Basis der absoluten (nicht-normierten) Daten widerspiegelte das Verhältnis der Geschlechter ein signifikant höheres Vorkommen an Weibchen an allen Fangorten und Fangjahren (2010, 2011). Entsprechende Daten sind in Tab. 15 aufgeführt.

Tab. 15: Überblick zu den absoluten (n absol.) und relativen (n rel. %) Fangzahlen weiblicher und männlicher *D. reticulatus* für alle Standorte unter Angabe der 95 % Konfidenzintervalle (KI). Unterschiedliche Indizes (^{a/b}) zeigen signifikante Unterschiede im Geschlechterverhältnis innerhalb der einzelnen Fangorte an ($p \leq 0,005$).

	Jahr 2010			Jahr 2011		
	n absol.	n rel. (%)	95 % KI (%)	n absol.	n rel. (%)	95 % KI (%)
Güterfelde						
Weibchen	513	56,6 ^a	53,4-59,8	779	57,3 ^a	54,7-59,9
Männchen	393	43,4 ^b	40,2-46,6	580	42,7 ^b	40,1-45,3
Gatow						
Weibchen	669	55,1 ^a	52,3-57,9	1095	56,8 ^a	54,6-59,0
Männchen	545	44,9 ^b	42,1-47,7	833	43,2 ^b	41,0-45,4
Falkenberg						
Weibchen	230	57,5 ^a	52,6-62,3	381	60,6 ^a	56,7-64,3
Männchen	170	42,5 ^b	37,8-47,4	248	39,4 ^b	35,7-43,3
K. Wusterh.						
Weibchen	382	58,2 ^a	54,4-61,9	455	58,6 ^a	55,1-62,0
Männchen	274	41,8 ^b	38,1-45,6	322	41,4 ^b	38,0-44,9

Ergebnisse

Demnach war das Auftreten weiblicher *D. reticulatus* im Jahr 2010 mit 55,1 % in Gatow bis 58,2 % in K. Wusterh. signifikant größer als das der Männchen (jeweils $p < 0,005$). Auch im Jahr 2011 wurden weibliche Zecken mit Anteilen von 56,8 % in Gatow bis 60,6 % in Falkenberg signifikant häufiger gesammelt (jeweils $p < 0,001$). In Abhängigkeit vom Standort war im Jahr 2011 eine relative Zunahme weiblicher Zecken um 0,3–3,1 % im Vergleich zum Vorjahr zu verzeichnen. Der Unterschied war an keinem der Standorte signifikant (Mid-P Exakt Test). Die Betrachtungen der Geschlechterverhältnisse unter dem Gesichtspunkt der Saisons bestätigten die signifikant größeren Anteile weiblicher *D. reticulatus* innerhalb der zeckenreichen Saisons Frühjahr und Herbst für jeden Standort (\emptyset 2010/2011, jeweils $p < 0,001$). Ein Vergleich beider Saisons untereinander zeigte einen um 4,4-6,9 % höheren Anteil an weiblichen Zecken in der Frühjahrssaison an sämtlichen Standorten. Sowohl für Gatow als auch K. Wusterh. war dieser Unterschied signifikant (Mid-P Exakt Test, jeweils $p < 0,05$). Abbildung 5 veranschaulicht die Geschlechterverhältnisse für die Frühjahrs- und Herbstsaison für alle Standorte. Auch in der Wintersaison ($n=55$ bis 261) übertraf die Anzahl weiblicher Buntzecken (52,7-68,5 %) die der männlichen Vertreter, jedoch war der Unterschied ausschließlich an den Standorten Güterfelde und K. Wusterh. signifikant (jeweils $p < 0,05$).

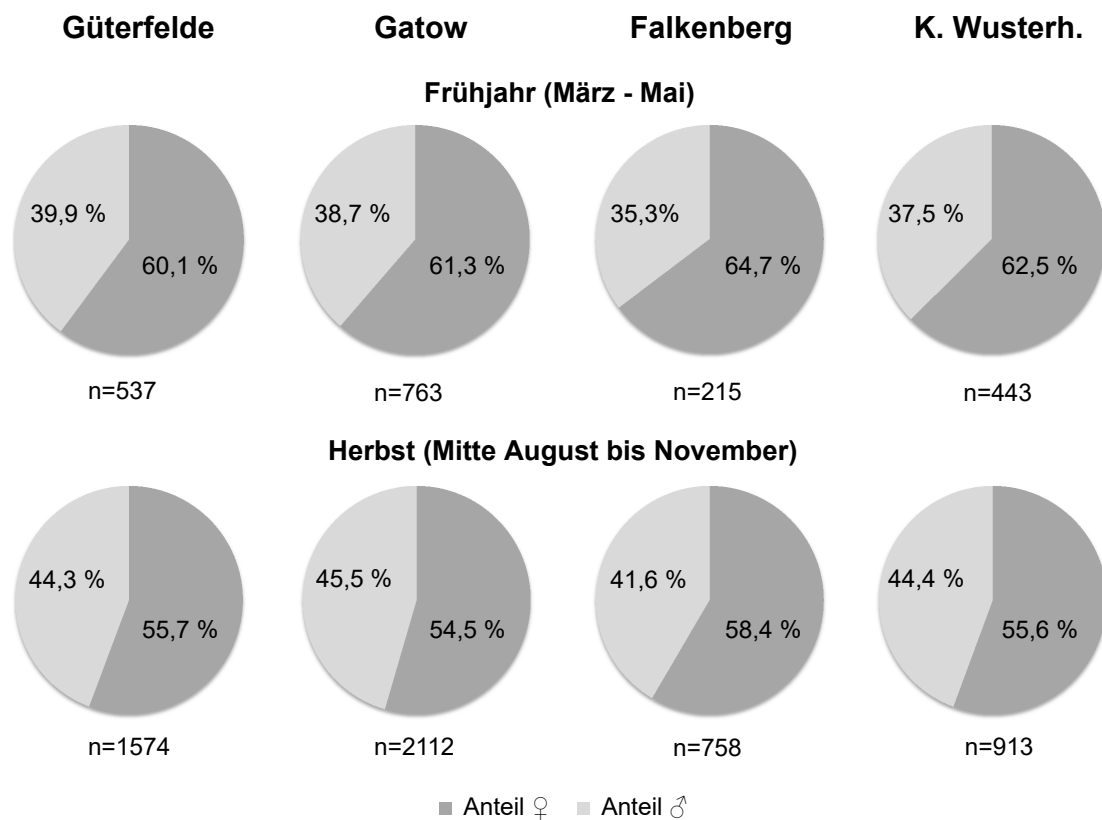


Abb. 5: Anteile männlicher und weiblicher *D. reticulatus* innerhalb der Saisons Frühjahr und Herbst für alle Standorte (2010 und 2011 zusammen). Sämtliche Geschlechterverhältnisse sind signifikant unterschiedlich (jeweils $p < 0,001$). Grafik beruht auf den nicht-normierten Daten.

4.1.4 Einflussfaktoren auf die Aktivität von *Dermacentor reticulatus*

4.1.4.1 Beschreibung der Zeckenaktivität unter Betrachtung abiotischer Parameter

4.1.4.1.1 Parameter Fangort

Zwischen den Fangorten waren deutliche Unterschiede in den Aktivitätshöhen der Buntzecken erkennbar. Die meisten *D. reticulatus* wurden in Gatow geflaggt (n=3142), gefolgt von Güterfelde (n=2265), K. Wusterh. (n=1433) und Falkenberg (n=1029) (Tab. 13). Diese Standortreihenfolge konnte in beiden Jahren beobachtet werden. Mit einer Dichte von 88,5 gesammelten Buntzecken/h (\bar{x} 2010/2011) überstieg Gatow die Zeckendichte der anderen Fangorte um das 1,45-fache (Güterfelde), 2,16-fache (K. Wusterh.) bzw. 2,85-fache (Falkenberg). Diese Reihenfolge lag auch beim standortabhängigen Vergleich der Saisons Frühjahr, Herbst und Winter vor. Eine Ausnahme bildete die Herbstsaison 2011, wonach K. Wusterh. die geringste durchschnittliche Anzahl an Zecken/h aufwies. Tabelle 14 liefert einen Überblick über die hier genannten Fangzahlen/h.

4.1.4.1.2 Parameter Jahr

Die Jahre 2010 und 2011 umfassten Sammelzeiträume unterschiedlicher Länge, zwischen denen die absolute Anzahl gesammelter Buntzecken mit 3176 (2010) bzw. 4693 (2011) Exemplaren divergierte (Tab. 13). Aufgrund der ausgeprägten Saisonalität der Zecken ist ein Vergleich der Jahre unter diesen Umständen schwierig. Bei der Auswertung der Daten sind damit zwei Betrachtungsweisen möglich: 1) Bei dem Vergleich der tatsächlich beprobten Fangzeiträume (2010: März-November, 2011: Januar-November) war die Dichte von *D. reticulatus*/h 2010 mit 55,6 Zecken identisch zu den in 2011 gesammelten 55,4 Exemplaren/h (Tab. 14). Innerhalb der Standorte Gatow und Falkenberg blieb dabei die ermittelte Zeckendichte/h zwischen den Untersuchungsjahren mit einem Unterschied von 1,5-3 *D. reticulatus* relativ konstant. Dahingegen war im Jahr 2011 am Standort Güterfelde eine Zunahme der Zeckenanzahl um 13,1 % (8,5 Zecken/h) bzw. am Standort K. Wusterh. eine Abnahme um 20,9 % (9,8 Zecken/h) im Vergleich zum Vorjahr zu verzeichnen. Durch das ausgeprägte saisonale Verhalten fließen bei dieser Betrachtungsweise jedoch Perioden unterschiedlicher Zeckenaktivität in den Datenvergleich ein. 2) Durch das Entfernen der Daten aus dem Jahresbeginn 2011 ist hingegen ein Vergleich identischer Sammelzeiträume (März-November) möglich. Dieser Vergleich ist jedoch nur grob möglich, da in den beiden Jahren nicht an absolut identischen Kalendertagen gesammelt wurde. Außerdem wird damit ein starrer Zeitraum geschaffen, der eine mögliche Variabilität z. B. im Temperaturverlauf oder Vegetationsaufwuchs in der jeweiligen Saison und möglicherweise damit einhergehende Verschiebungen in den Zeckenaktivitäten nicht berücksichtigt. Bei diesem

Vergleich ist die durchschnittliche Zeckenzahl/h mit 55,6 (2010) bzw. 54,8 (2011) Exemplaren dennoch ebenfalls nahezu identisch. Aufgegliedert in die einzelnen Standorte wurde eine Abnahme der Zecken/h von 2010 zu 2011 in Falkenberg (32,5 vs. 30,3) und K. Wusterh. (46,9 vs. 37,2) dokumentiert. In Gatow (86,7 vs. 85,4) und Güterfelde (56,2 vs. 67,1) war die Dichte nahezu identisch bzw. 2011 vergleichsweise höher.

Während der zeckenreichen Saisons Frühjahr und Herbst wurden ebenfalls Unterschiede in der Anzahl gesammelter Zecken zwischen den Jahren deutlich, wobei die Entwicklungen in den genannten Saisons ein gegenläufiges Muster zeigten. Im Vergleich zum Frühjahr 2010 lag die ermittelte Aktivität von *D. reticulatus* in derselben Jahreszeit 2011 an allen Standorten zusammen mit 65,3 Exemplaren/h weitaus höher (+42 Zecken/h). Die Erhöhung wurde durch einen Anstieg der Anzahl gesammelter *D. reticulatus*/h um den Faktor 1,91 (Gatow), 2,77 (Falkenberg), 2,81 (K. Wusterh.) und 4,34 (Güterfelde) verursacht. Der unterschiedliche Sammelbeginn zwischen dem Frühjahr 2010 und 2011 führt womöglich zu der großen Differenz zwischen den Jahren. Durch Entfernung der Sammeldaten im Frühjahrsbeginn 2011 und der Betrachtung der übereinstimmenden Zeiträume (Ende März-Ende Mai), zeigt sich jedoch ein ebenfalls höheres Vorkommen an Buntzecken im Frühjahr 2011. Somit wurden mit 55,4 Zecken/h 32,7 Exemplare/h mehr gesammelt als im Jahr 2010. Im Gegensatz dazu reduzierte sich die Zeckendichte, bedingt durch eine Abnahme an allen Standorten, in der Herbstsaison von 2010 (121,4/h) zu 2011 (85,3/h). In Güterfelde, Gatow und Falkenberg betrug die durchschnittliche Anzahl an *D. reticulatus*/h im Herbst 2011 nur noch das 0,8-fache desselben Zeitraumes des Vorjahres. Am Standort K. Wusterh. war die Zeckendichte sogar auf die Hälfte reduziert (Faktor 0,49).

4.1.4.1.3 Parameter Saison

Innerhalb eines Jahres ließ sich das Aktivitätsverhalten von *D. reticulatus* einzelnen Saisons zuordnen, welche im Großen und Ganzen den meteorologischen Jahreszeiten entsprachen (Kapitel 4.1.2). Einen Überblick über die Anzahl gesammelter Buntzecken/h, getrennt nach Standort, Jahr und Saison, liefert Tab. 14. Hohe Aktivitätsphasen traten in der Frühjahrs- und Herbstsaison auf, welche in ihren Verläufen ungefähr symmetrischen Optimumskurven entsprachen. In der Frühjahrssaison lag die durchschnittliche Anzahl gesammelter Zecken/h an allen Standorten zusammen bei 23,3 (2010) und 65,3 (2011) Exemplaren. Mit einer Dichte von 121,4 (2010) bzw. 85,3 (2011) Individuen/h überstieg die Herbstsaison die der Frühjahrsmonate um den Faktor 5,21 (2010) bzw. 1,31 (2011). Mit Ausnahme von K. Wusterh. (Jahr 2011) war diese Entwicklung an allen übrigen Fangorten für beide Saisons zu verzeichnen. Diese Vergleiche dürfen jedoch nur unter Vorbehalt erfolgen, da die Daten für das Frühjahr 2010 aufgrund des späten Studienbeginns unvollständig erscheinen. In den

Ergebnisse

beiden verbleibenden Saisons wurden nahezu keine (Sommer) bzw. unregelmäßig (Winter) Buntzecken gesammelt. Mit durchschnittlich 0,42 (2010) bzw. 0,3 (2011) geflaggtten Individuen/h wurden in der Sommersaison vergleichsweise wenig Zecken gesammelt. Dahingegen wurden in der Wintersaison zwar wenige unregelmäßige Probennahmen (9 Fangtermine) durchgeführt, allerdings war *D. reticulatus* mit durchschnittlich 60 Exemplaren/h relativ aktiv (Winter 2010/2011).

4.1.4.1.4 Wetterbedingte Einflüsse auf die Zeckenaktivität

Meteorologische Faktoren gelten als wichtige Einflussgrößen auf die Zeckenaktivität. Im Rahmen dieser Studie wurde die Bedeutung der Temperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit untersucht. Mithilfe einer mobilen Wetterstation wurden beide Parameter einmalig an jedem Fangtermin vor Ort bestimmt. Tabelle 16 listet die erhaltenen Durchschnittswerte im Jahresverlauf sowie die monatlichen Minimal- und Maximalwerte auf. Abbildung 6 gibt hingegen sämtliche Messdaten zusammen mit den entsprechenden Fangzahlen von *D. reticulatus* im Detail wieder.

Tab. 16: Darstellung der berechneten Durchschnittswerte (\bar{x}) sowie der Schwankungsbereiche von Temperatur und relativer Luftfeuchtigkeit für alle Kalendermonate basierend auf den vor Ort gemessenen Daten aller Standorte und Jahre (2010-2012) zusammen. Min = Minimum, Max = Maximum

Monat	n Fang- termine	Temperatur (°C)			RH (%)		
		\bar{x}	Min	Max	\bar{x}	Min	Max
Januar	6	3,4	-0,5	6	76,8	67	83
Februar	6	3,7	1	8	47,5	29	57
März	15	11,3	5	16	47,7	38	75
April	14	15,1	6,7	24	44,4	25	67
Mai	15	18	10	25	46,9	24	75
Juni	17	22,5	17	30	44,3	26	59
Juli	14	24,5	15	30	45,8	30	87
August	16	21,7	15	29	54,9	40	66
September	17	18	11,5	23	51,6	42	69
Oktober	15	12,3	8	18,5	62,7	51	85
November	13	6,7	-1,1	14	75,9	55	90
Dezember	1	4,5	-	-	88,0	-	-

Ergebnisse

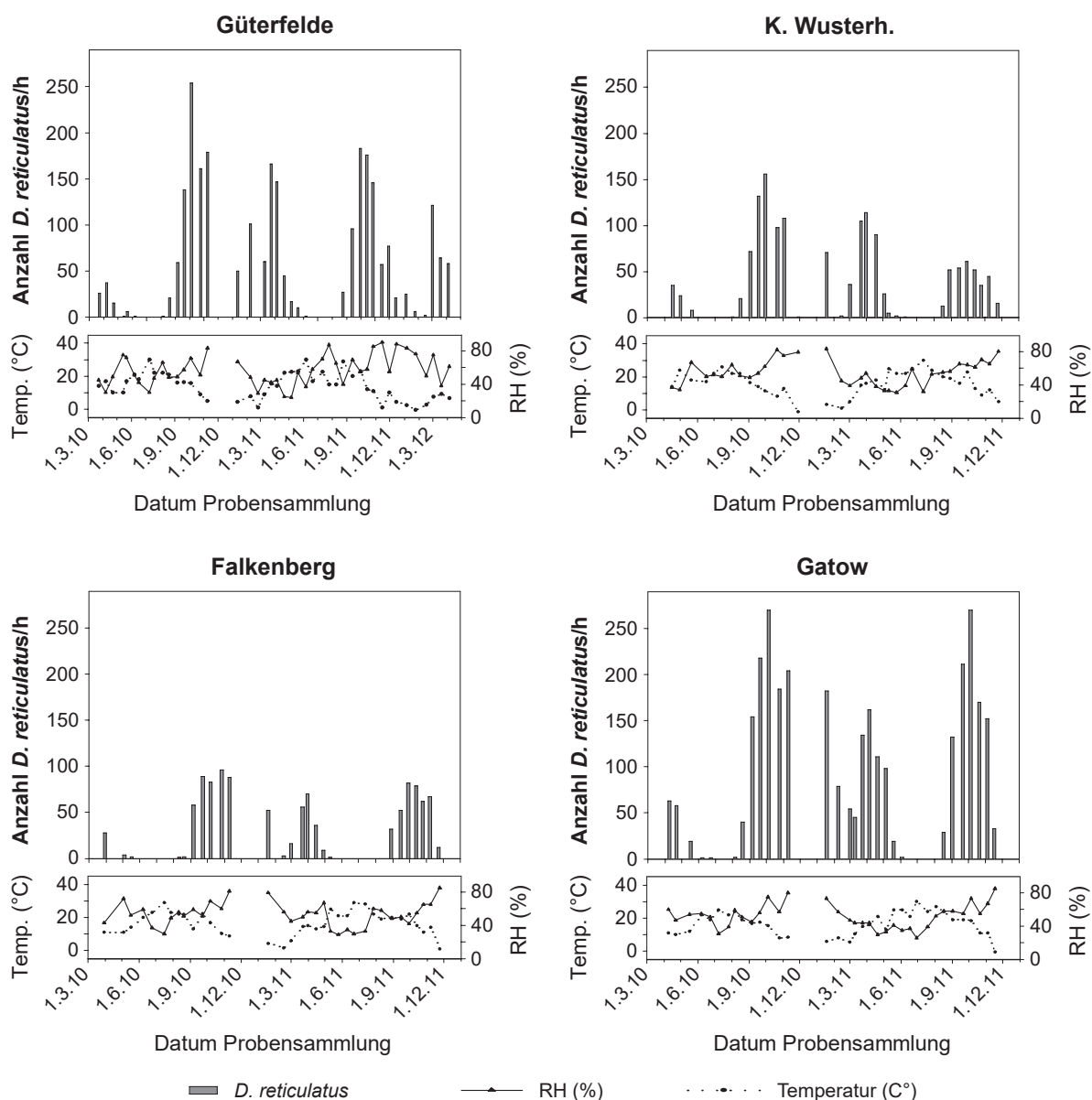


Abb. 6: Gemeinsame Darstellung der Anzahl gesammelter *D. reticulatus* pro Stunde sowie der vor Ort gemessenen Temperatur- und relativen Luftfeuchtigkeitswerte für alle Standorte für den Zeitraum 2010 und 2011. Am Standort Güterfelde wurde die Aktivität bis April 2012 dokumentiert. Das Fehlen der Datendarstellung von Dezember 2010 bis Februar 2011 beruht auf einer Unterbrechung der Probenahme in diesem Zeitraum.

Temperatur

Anhand der Verlaufskurven in Abb. 6 und den Durchschnittstemperaturen in Tab. 16 ist ersichtlich, dass der Temperaturverlauf im Jahresgang einen ungefähr glockenförmigen Charakter mit Maximalwerten im Monat Juli annahm. Zum Vergleich ist ebenso das zweigipfelige Aktivitätsverhalten von *D. reticulatus* in den Abbildungen dargestellt. In der ersten der beiden Aktivitätsphasen, welche der Frühjahrssaison entsprach, kam es zu einem stetigen Anstieg der durchschnittlichen Temperatur von 11,3 °C (März) auf 18 °C (Mai). Die

Ergebnisse

Aktivität von *D. reticulatus* stieg in dieser Phase zunächst an, fiel nach Erreichen eines Maximums bei weiterhin steigender Temperatur gegen Ende Mai hin aber wieder ab. In der Sommersaison, andauernd von Juni bis Mitte August, lag die durchschnittliche Temperatur zunächst bei 22,5 °C, erreichte im Juli ihr jährliches Maximum (24,5 °C) und fiel schließlich bis Mitte August (21,9 °C; 8 Fangtermine in 1. Augushälfte) zunehmend ab. In diesem Zeitraum wurde nahezu keine Aktivität von *D. reticulatus* dokumentiert. In der darauffolgenden zweiten Aktivitätsphase, welche der Herbstsaison entsprach, sank die Durchschnittstemperatur von Mitte August (22,1 °C; 8 Fangtermine in 2. Augushälfte) bis Ende November (6,7 °C) stetig ab. Das Aktivitätsverhalten von *D. reticulatus* widerspiegelte in dieser Phase eine ungefähr symmetrische Optimumskurve, wie sie schon in gleicher Weise im Frühjahr beobachtet wurde.

An Tagen der Saisons Frühjahr und Herbst, an denen an den jeweiligen Fangorten die Maximalzahlen von *D. reticulatus* ermittelt wurden, lagen die Durchschnittstemperaturen mit 15,6 °C (Spanne 15-16 °C; Frühjahr 2011; 2010 nicht berücksichtigt) bzw. 17,4 °C (10,2-23 °C; Herbst beide Jahre) relativ nah beieinander. Weiterhin verdeutlichten die gesammelten Daten der verschiedenen Saisons, dass *D. reticulatus* zum einen in einem großen Temperaturbereich aktiv war und zum anderen unterschiedliche Aktivitätsgrade trotz ähnlicher Temperaturbereiche annahm. Demnach wurden im Frühjahr 2011 (2010 unvollständige Daten) für alle Standorte gemittelte Minimal- bzw. Maximaltemperaturen von 6,4 °C (5-9 °C) und 24,5 °C (23-25 °C) gemessen. Die durchschnittliche Anzahl gefangener Buntzecken lag an diesen Fangtagen entsprechend bei 41,5 (16-60) bzw. 8,75 (1-19) Zecken/h. Im Herbst (Ø 2010/2011) wurden durchschnittliche Temperaturwerte von minimal 3,4 °C (-1,1-8,7 °C) bis maximal 22,5 °C (20-29 °C) dokumentiert. Die ermittelten Fangwerte lagen hier bei 71,5 (13-179) bzw. 29,6 (6-40) Zecken/h. Darüber hinaus verdeutlichte die fehlende Aktivität von *D. reticulatus* an kühlen Sommertagen, an denen die Temperatur durchaus vergleichbar mit gemessenen Werten im Frühjahr oder Herbst war, das variierende Verhalten dieser Zeckenspezies. Beispielsweise wurden in Güterfelde (2011) zu ähnlichen Tageszeiten bei ungefähr 15 °C 166 (Ende März) bzw. 0 (Ende Juli) *D. reticulatus* geflaggt.

Ein Vergleich zwischen den Fangjahren 2010 und 2011 war aufgrund der Datenlage nur für die Saison Herbst sinnvoll. Mit Beginn der Saison verhielten sich die durchschnittlichen Temperaturen mit 21 °C (20-29 °C; Jahr 2010) und 23,3 °C (19-22 °C; Jahr 2011) als auch die zu diesen Zeitpunkten gemessene durchschnittliche Anzahl aktiver Zecken/h mit 22 (13-32; Jahr 2010) und 25,3 (6-40; Jahr 2011) Exemplaren in beiden Jahren ähnlich. Ab ca. Anfang November wurde an den meisten Fangorten eine tendenziell rückläufige Zeckenaktivität beobachtet. Dennoch traten Schwankungen der Zeckenzahl, aber auch der Temperaturen, in dieser Zeit auf. Demnach wurden am Standort Güterfelde 2011 bei 1 °C 57 Zecken/h gesammelt, zwei Wochen später wurden hingegen bei 10 °C 77 Zecken/h

gefunden. Die Variabilität in der Anzahl geflaggter Zecken war in den Wintermonaten noch deutlicher ausgeprägt. Nach dem Abschmelzen einer wochenlang bestehenden Schneedecke im Januar 2011 wurden in Abhängigkeit vom Fangort 50-182 Zecken/h bei durchschnittlichen Temperaturen von 4,6 °C (3,4-6 °C) gesammelt. In der schneefreien ersten Monatshälfte im Februar 2011 wurden ebenfalls 79 bis 101 Exemplare/h bei durchschnittlich 8 °C (7,8-8 °C) dokumentiert. Mit Absinken der Temperatur auf 1-1,5 °C wurden in der zweiten Monatshälfte nur noch 0-3 Zecken/h gefunden.

Relative Luftfeuchtigkeit

Die relative Luftfeuchtigkeit wurde zusätzlich neben der Temperatur an jedem Fangtag vor Ort gemessen (Abb. 6). Die durchschnittlichen Messdaten für jeden Monat sind in Tab. 16 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die relative Luftfeuchtigkeit über das Jahr hinweg tendenziell einen umgekehrten glockenförmigen Verlauf annahm. In der zeckenreichen Frühjahrssaison lag sie relativ stabil bei durchschnittlich 46,3 %. In den Monaten der zeckenarmen Sommersaison wurden die niedrigsten Werte gemessen und erreichten im Juni mit 44,3 % ihren Tiefstwert. In der im Anschluss folgenden zeckenreichen Herbstsaison nahm die durchschnittliche Feuchte von 50,3 % ab Mitte August bis 75,9 % im November wieder stetig zu. Trotz der Verlaufstendenz dieses Parameters während eines Jahres war eine Beschreibung der Messwerte im Zusammenhang mit der Aktivität von *D. reticulatus* schwer möglich. Im Gegensatz zu den Temperaturwerten, die in Abhängigkeit von der Jahreszeit nahezu stetig zu- oder abnahmen, zeigte die relative Luftfeuchtigkeit plötzliche und immense Schwankungen zwischen einzelnen Fangtagen innerhalb eines Standortes oder einer Saison. Darüber hinaus gilt es zu beachten, dass die Probennahme an Tagen an denen die Vegetation durch Regen oder mangelndes Abtrocknen feucht war, was vermeintlich Tagen mit einer hohen relativen Luftfeuchtigkeit entsprach, nicht durchgeführt wurde und damit keine Aussagen über die Aktivität von *D. reticulatus* unter diesen Bedingungen getroffen werden konnten.

4.1.4.2 Negativ-Binomial-Regressionsanalyse zur Beurteilung der Bedeutung abiotischer Parameter für die Zeckenaktivität

Die Aktivität adulter Buntzecken wird vermutlich über eine Vielzahl abiotischer und biotischer Faktoren beeinflusst. Wie in den Kapiteln 4.1.4.1.1 bis 4.1.4.1.4 aufgeführt, scheinen Unterschiede in der Aktivität von *D. reticulatus* insbesondere unter Betrachtung der Fangorte, der Saisons und der Temperatur aufzutreten. Publikationen von Mierzejewska et al. (2015a) und Hubálek et al. (2003a) gaben zudem Anlass die Aktivität auch in Abhängigkeit vom klimatischen Parameter relative Luftfeuchtigkeit als auch vom Zeitfaktor

Ergebnisse

Jahr zu prüfen. Um mögliche Einflüsse dieser unabhängigen Variablen (Standort, Jahr (2010, 2011), Saison, Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit) auf die Aktivität von *D. reticulatus* gemeinsam zu untersuchen, wurden diese mithilfe einer Negativ-Binomial-Regressionsanalyse statistisch ausgewertet. Das entstandene Grundmodell (Modell 1A), welches zunächst sämtliche genannten Variablen beinhaltete, wurde einer Rückwärtsselektion unterzogen. Anhand der Höhe des aus der Modellrechnung hervorgehenden AICs und der Prüfung mittels Wald-Test wurde der Parameter relative Luftfeuchtigkeit als nicht relevante Variable identifiziert. Die Entfernung der relativen Luftfeuchtigkeit brachte das Schlussmodell 1B hervor, welches mit einem Wert von 1110,9 den vergleichsweise niedrigsten und damit besten AIC aufwies und die übrigen Variablen Standort, Jahr, Saison und Temperatur beinhaltete. Mit Ausnahme des Faktors Jahr übten alle drei verbleibenden Variablen einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität von *D. reticulatus* aus. Entsprechende detaillierte Erläuterungen zur Bedeutung dieser Faktoren werden in den nachfolgenden Kapiteln 4.1.4.2.1 bis 4.1.4.2.4 gegeben. Tabelle 17 stellt beide Modelle anhand der Variablen, AICs und der Pseudo-R²-Maße (McFadden, Nagelkerke) vergleichend gegenüber. Letztere zeigen zwischen beiden Modellen jeweils nahezu identische Werte. Demnach wird durch die Variablen in beiden Modellen die Aktivität der Zecken in etwa gleich gut erklärt. Das Pseudo-R² nach Nagelkerke (0,805), welches dicht an „1“ liegt, und das Pseudo-R² nach McFadden (0,176), welches in Abhängigkeit von der vorliegenden Referenz schon ab einem Wert von 0,2 bzw. 0,4 als sehr gut gilt (Louviere et al. 2000, Hedderich und Sachs 2015), verdeutlichen eine gute Anpassung des Schlussmodells 1B durch die erfassten erklärenden Variablen an die vorhandenen Daten. Dennoch zeigen diese Werte, dass nicht alle auf die Zeckenaktivität Einfluss nehmenden Faktoren in dem Modell erfasst wurden. Auf Grundlage der vorgegebenen Daten untermauerte der im statistischen Vergleich des Schlussmodells mit dem Nullmodell auftretende signifikante Unterschied die Wahl eines guten Modells. Darüber hinaus bestätigte der signifikante Unterschied zum Poisson-Modell ebenso die Anwendung des Negativ-Binomial-Modells, welches im Gegensatz zum Poisson-Modell auch mit Daten, die eine Überdispersion zeigen, arbeiten kann.

Zur grafischen Veranschaulichung des Modells 1B wurde Abb. 7 erstellt. Diese zeigt sowohl die tatsächlich gesammelten Zeckenzahlen (Punkte) als auch die mithilfe der Regressionsanalyse modellierten Zeckenzahlen (Verlaufskurven). In der Grafik selbst wurden beispielhaft ausgewählte Teilabbildungen zusammengefügt, welche die Unterschiede in der Buntzeckenaktivität in Abhängigkeit von Standort, Saison und Temperatur aufzeigen. Die errechneten Kurven in den Grafiken besagen, dass die tatsächliche Aktivität mit einer 95 %igen Wahrscheinlichkeit in diesem Bereich liegt. Die Abbildungen zeigen, dass die errechneten Kurven zum Großteil optisch gut den realen Werten angepasst sind. Eine Ausnahme stellt die Teilabbildung „B: K. Wusterh.“ dar, wonach die modellierte Aktivitätskurve der Zecken über den tatsächlichen Fangwerten lag.

Tab. 17: Vergleichende Darstellung des mittels Negativ-Binomial-Regressionsanalyse berechneten Grund- und Schlussmodells. Zur Beurteilung der Variablen sind die errechneten Schätzwerte und die dazugehörigen p-Werte (Level-Ebene), die im Wald-Test ermittelten p-Werte (Variablen-Ebene) sowie die Rate Ratios mit den entsprechenden 95 % Konfidenzintervallen (KI) aufgeführt (n.b. = nicht berechnet; Wald-T. = Wald-Test).

	Grundmodell 1A						Schlussmodell 1B					
	Schätzwert	Standardfehler	p-Wert	Wald-T. p-Wert	Rate Ratio	95 % KI	Schätzwert	Standardfehler	p-Wert	Wald-T. p-Wert	Rate Ratio	95 % KI
Intercept	3,092	0,955	0,001		22,026	2,922-179,707	2,345	0,377	<0,001		10,438	4,817-23,568
Wetterdaten												
Temperatur	0,329	0,049	<0,001	<0,001	1,389	1,250-1,538	0,284	0,043	<0,001	<0,001	1,328	1,212-1,448
Temperatur ²	-0,011	0,002	<0,001		0,989	0,985-0,992	-0,010	0,001	<0,001		0,989	0,987-0,993
RH	-0,045	0,036	0,210	0,28	0,956	0,883-1,031	n.b.					
RH ²	0,0004	0,0003	0,159		1,000	0,999-1,001	n.b.					
Jahr: 2010 vs. ...												
2011	0,3	0,153	0,050	0,05	1,349	0,977-1,859	0,288	0,155	0,063	0,063	1,334	0,962-1,845
Ort: Gatow vs. ...												
Falkenberg	-1,067	0,204	<0,001		0,344	0,230-0,514	-1,083	0,206	<0,001		0,339	0,226-0,508
Güterfelde	-0,378	0,197	0,055	<0,001	0,685	0,465-1,006	-0,355	0,197	0,072	<0,001	0,701	0,474-1,034
K. Wusterh.	-0,739	0,2	<0,001		0,477	0,321-0,709	-0,724	0,202	<0,001		0,485	0,325-0,723
Saison: Frühjahr vs. ...												
Sommer	-4,302	0,338	<0,001		0,014	0,006-0,027	-4,264	0,332	<0,001		0,014	0,007-0,027
Herbst	0,917	0,189	<0,001	<0,001	2,501	1,607-3,866	0,948	0,159	<0,001	<0,001	2,582	1,838-3,619
Winter	0,705	0,337	0,037		2,023	1,059-3,984	0,674	0,329	0,040		1,962	1,066-3,742
	AIC: 1112,4 R ² : Mc Fadden (0,178), Nagelkerke (0,808)						AIC: 1110,9 R ² : Mc Fadden (0,176), Nagelkerke (0,805)					

Ergebnisse

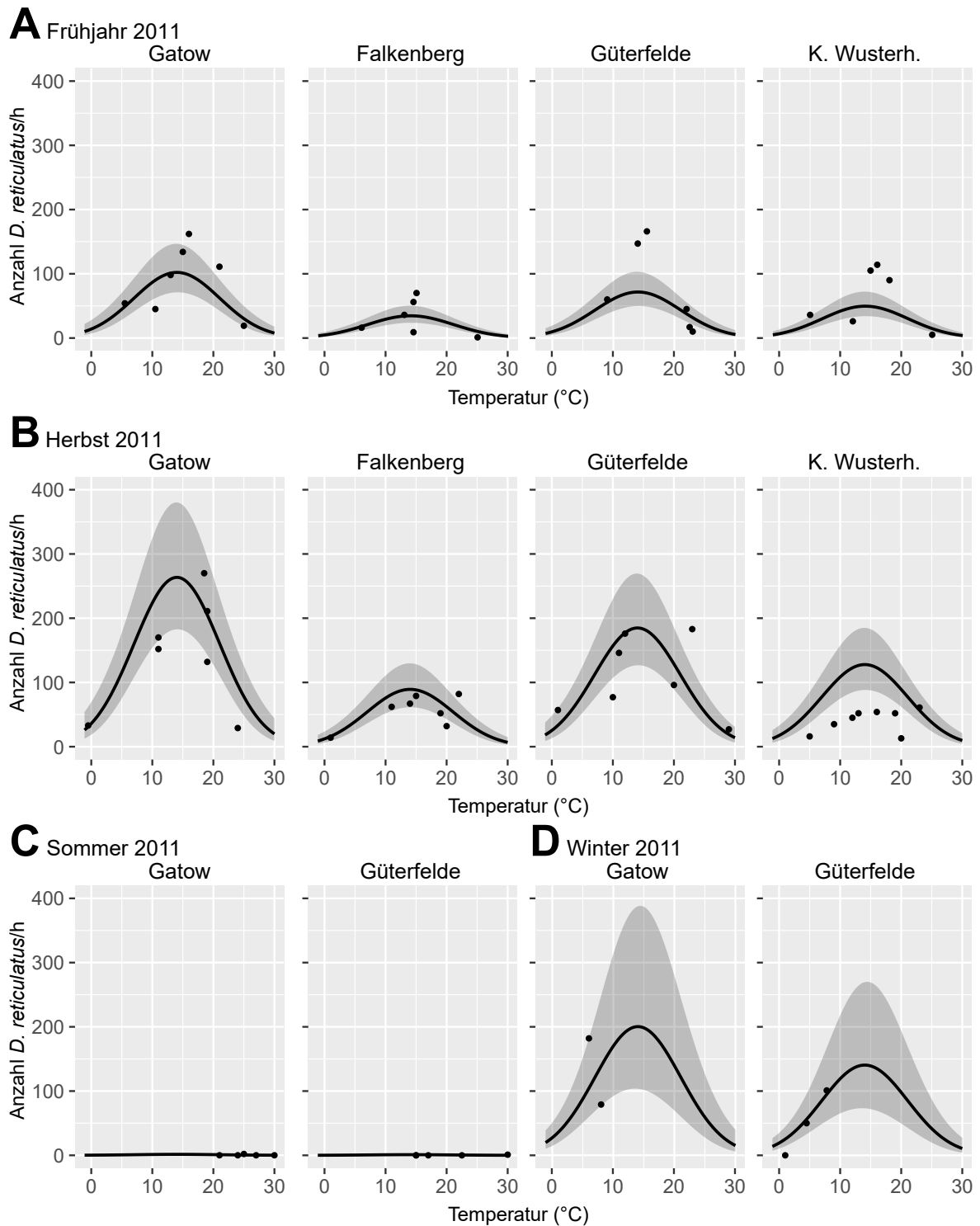


Abb. 7: Grafik zum mittels Negativ-Binomial-Regressionsanalyse erstellten Modell 1B mit Darstellung der modellierten (Kurve) und tatsächlichen (Punkte) Fangwerte von *D. reticulatus* (Anzahl der Zecken pro Stunde). Der graue Bereich um die Kurve zeigt das 95% Konfidenzintervall. Die Daten sind für die Parameter Standort und Saison in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt und werden beispielhaft anhand der Teilabbildungen für das Jahr 2011 wiedergegeben. Aufgrund der geringen Aktivität (Sommer) bzw. geringen Anzahl an Fangterminen (Winter) sind die Standorte Gatow und Güterfelde für diese Saisons exemplarisch dargestellt.

4.1.4.2.1 Bedeutung des Faktors Standort

Unter Berücksichtigung der weiteren Variablen bestätigte sich in der Negativ-Binomial-Regressionsanalyse der wichtige Einfluss des Parameters Standort auf die Aktivität von *D. reticulatus*. Im Vergleich zu den Standorten Falkenberg und K. Wusterh. wurden unter Konstanzhaltung aller anderen Faktoren in Gatow 2,95-mal (95 % KI: 1,97-4,43; $p < 0,001$) bzw. 2,06-mal (95 % KI: 1,38-3,08; $p < 0,001$) mehr Buntzecken gesammelt. Die im Vergleich zu Güterfelde scheinbar 1,43-fach (95 % KI: 0,97-2,11, $p = 0,072$) höhere Zeckendichte verfehlte jedoch knapp die Signifikanz. Anhand der 95 % Konfidenzintervalle konnten zudem keine signifikanten Unterschiede zwischen den Standorten Güterfelde, Falkenberg und K. Wusterh. ausgemacht werden (Tab. 17). Bei Betrachtung von Abb. 7 können die vom Modell berechneten erwarteten Verlaufskurven für die *D. reticulatus*-Aktivität für die vier Standorte am Beispiel der zeckenreichen Saisons Frühjahr und Herbst im Jahr 2011 abgelesen werden. Die unterschiedliche Höhe der Verlaufskurven verdeutlicht die standortabhängigen Differenzen in den Zeckenaktivitäten.

4.1.4.2.2 Bedeutung des Faktors Jahr

Die statistische Auswertung des Faktors Jahr in der Negativ-Binomial-Regressionsanalyse beruhte, aufgrund der ausschließlich für die Jahre 2010 und 2011 für alle vier Standorte vorliegenden Daten, auf diesen beiden Jahren. Sämtliche für 2010 und 2011 vorliegenden Daten sind in die Berechnung eingeflossen. Unter gleichzeitiger Betrachtung der Variablen Standort, Saison und Temperatur konnte kein signifikanter Einfluss durch den Faktor Jahr ermittelt werden (95 % KI: 0,96-1,85 %; $p = 0,063$).

4.1.4.2.3 Bedeutung des Faktors Saison

Unter Betrachtung des Zusammenwirkens der verschiedenen Faktoren im statistischen Modell bestätigte sich der signifikante Einfluss des Parameters Saison auf die Aktivität von *D. reticulatus*. In Übereinstimmung mit den genannten Beobachtungen zeigte das Modell unter Konstanzhaltung aller anderen Faktoren eine erhöhte Zeckenanzahl in der Herbstsaison im Vergleich zur Frühjahrssaison. Mit einer 2,58-fachen Erhöhung war dieser Unterschied höchst signifikant (95 % KI: 1,84-3,62 %; $p < 0,001$). Die im Vergleich zum Frühjahr bestimmte Reduktion der Anzahl geflaggter Zecken während der Sommermonate auf 1,4 % war ebenfalls höchst signifikant (95 % KI: 0,67-2,71 %; $p < 0,001$). Die Modellierung ergab außerdem einen signifikanten Unterschied zwischen der Frühjahrssaison und der Wintersaison (95 % KI: 1,07-3,74 %; $p < 0,05$). Demnach stieg die Anzahl der Zecken/h unter den gegebenen Bedingungen in den Wintermonaten um das 1,96-fache. Bei Betrachtung der

95 % Konfidenzintervalle der Saisons Sommer bis Winter wurde zudem der signifikante Unterschied der Sommersaison gegenüber den Saisons Herbst und Winter deutlich (Tab. 17). Abbildung 7 veranschaulicht die saisonale Variabilität anhand der Anzahl tatsächlich gefangener Zecken (Punkte) und der modellierten Werte (Verlaufskurven). Die Teilabbildungen verdeutlichen die hier genannten Unterschiede bezüglich der ermittelten Zeckenzahl in den Saisons Frühjahr und Herbst für alle vier Standorte. Die Sommer- und Wintersaison ist anhand der Fangorte Gatow und Güterfelde beispielhaft dargestellt.

4.1.4.2.4 Bedeutung der Temperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit

Temperatur

Die Erläuterungen in Kapitel 4.1.4.1.4 dokumentieren zunächst einen Anstieg der Zeckenaktivität von *D. reticulatus* bis zu einem bestimmten Temperaturwert, gefolgt von einem Rückgang der ermittelten Zeckenzahlen bis nahe Null mit zunehmend heißeren Temperaturen im Hochsommer. Aus diesem Grund wurde zwischen der metrischen Variable Temperatur und der Zeckenaktivität eine quadratische statt einer linearen Beziehung angenommen und diese daher in der Regressionsanalyse durch die beiden Parameter Temperatur und Temperatur² ausgedrückt. Es konnte ein signifikanter Einfluss der Temperatur bei zeitgleicher Betrachtung der verbleibenden Variablen (Modell 1B, Tab. 17) statistisch belegt werden ($p < 0,001$). Die resultierende glockenförmige Kurve war aufgrund des negativen Schätzwertes für Temperatur² (-0,010122) nach unten geöffnet. Unter Konstanthaltung aller anderen Faktoren stieg die Anzahl gesammelter Zecken/h mit zunehmender Temperatur zunächst an, erreichte bei einem Scheitelpunkt von 14,03 °C die maximale Zeckenaktivität und nahm anschließend mit weiter steigenden Temperaturen wieder ab (Abb. 7). Dieses Ergebnis erschien vereinbar mit den in Kapitel 4.1.4.1.4 detailliert beschriebenen realen Beobachtungen. Entsprechend dem Regressionsmodell wurden innerhalb des gemessenen Temperaturbereiches 80 % der Buntzecken in einer Spanne von 5,0-23,0 °C gefangen (Area under the curve-Berechnung ausgehend vom Scheitelpunkt 14,03 °C). Demnach sind nur jeweils 10 % der Zecken unterhalb von 5,0 °C bzw. oberhalb von 23 °C zu erwarten. Die Summierung der Anzahl gefangener Zecken nach fünf verschiedenen Temperaturklassen zeigte, dass zwischen -1,1 °C und 5,1 °C 512 Zecken aktiv waren, wohingegen in dem Temperaturbereich von 23,8-30 °C nur 110 Exemplare gefunden wurden. Zur grafischen Veranschaulichung der genannten Ergebnisse zeigt Abb. 7 die in Abhängigkeit von der Temperatur beobachteten Fangzahlen/h und die darauf basierenden erwarteten temperaturabhängigen Zeckenaktivitätskurven im Modell. Mit Ausnahme der Sommersaison war in allen verbleibenden Saisons erkennbar, dass die tatsächliche als auch die erwartete Anzahl an aktiven *D. reticulatus* diesem glockenförmigen

Verlauf entsprach. In der Sommersaison, der Zeit mit den höchsten Temperaturen im Jahr, lag sowohl die gemessene als auch die erwartete Zeckenanzahl/h bei nahezu Null.

Relative Luftfeuchtigkeit

Die Berechnung der Bedeutung der relativen Luftfeuchtigkeit im Zusammenhang mit den weiteren Variablen in der Negativ-Binomial-Regressionsanalyse zeigte keinen signifikanten Einfluss dieses Parameters auf die Aktivität von *D. reticulatus* unter den genannten Sammelbedingungen (Kapitel 3.2.1.1). Analog zu den Temperaturberechnungen wurde im Modell 1A (Tab. 17) ebenso für die relative Luftfeuchtigkeit von einem quadratischen Einfluss, welcher durch die Faktoren RH und RH^2 ausgedrückt wurde, ausgegangen. Die p-Werte von 0,210 (RH) und 0,159 (RH^2) verdeutlichten jedoch, dass die relative Luftfeuchtigkeit, unabhängig von ihrer Höhe, keinen Einfluss auf die Anzahl gesammelter *D. reticulatus* hatte. Aufgrund der daraus resultierenden Verbesserung des AIC wurde dieser Parameter im Modell 1B (Tab. 17) nicht weiter berücksichtigt.

4.1.5 Vergleichende Darstellung zu *Ixodes ricinus*

Mithilfe der stereomikroskopischen Untersuchung wurde neben der dominierenden Zeckenspezies *D. reticulatus* (n=8166) zusätzlich *I. ricinus* (n=1020) gefunden. Detaillierte Informationen zur Anzahl gefangener *I. ricinus*, deren Entwicklungsstadien und Geschlecht sind für jeden Fangtag in Tab. 24 bis Tab. 27 im Anhang aufgeführt. 2010 wurden mit durchschnittlich 10 Zecken/h nahezu doppelt so viele *I. ricinus* gefangen wie 2011 (5,4 Exemplare/h). Mit 16,2 Individuen/h (\bar{x} 2010/2011) wurden in Falkenberg die meisten *I. ricinus* geflaggt, gefolgt von K. Wusterh. (5,2/h), Güterfelde (4,1/h) und Gatow (3,7/h). Weitere Informationen zu den durchschnittlichen Fängen dieser Zeckenspezies sind, getrennt nach Standort, Jahr und Saison, der Tab. 18 zu entnehmen. Im Gegensatz zu den Buntzeckenfängen befanden sich unter den gesammelten *I. ricinus* sowohl adulte Zecken als auch Prämarginalstadien. Dementsprechend wurden 707 adulte *I. ricinus*, 402 Nymphen und 7 Larven dokumentiert. Im Vergleich zu den Prämarginalstadien überwog an den vier Standorten in der Mehrheit der Fälle die Zahl der Adulten. In Abhängigkeit vom Fangort reichte das Verhältnis zwischen den juvenilen und adulten Stadien von 1:1,5 (Güterfelde) bis 1:5,3 (K. Wusterh.). Lediglich in Falkenberg waren die Prämarginalstadien mit einem Verhältnis von 1,1:1 geringfügig häufiger vertreten. In Bezug auf die Geschlechterverteilung ist im Unterschied zu den *D. reticulatus*-Fängen, welche einen durchgehend höheren Anteil an weiblichen Zecken zeigten, kein einheitliches Verteilungsmuster an den Standorten erkennbar. Der durchschnittliche Anteil weiblicher *I. ricinus* beider Jahre reichte von 48,6 % in Falkenberg bis maximal 59,3 % in Güterfelde.

Ergebnisse

Tab. 18: Angabe der durchschnittlichen Fangzahl (\bar{x}) von *I. ricinus*/h sowie der minimalen (Min) und maximalen (Max) Fangzahlen/h getrennt nach Standort, Jahr und Saison. Die Werte basieren auf den normierten Daten (Kapitel 3.2.11.1). n = Anzahl der Fangtermine, n.d. = nicht untersucht

	Güterfelde			Gatow			Falkenberg			K. Wusterh.		
	\bar{x}	Min-Max	n	\bar{x}	Min-Max	n	\bar{x}	Min-Max	n	\bar{x}	Min-Max	n
Jahr 2010												
Frühjahr	7,0	0-22	5	3,7	0-11	3	32,9	14,7-40	3	12,0	6-18	3
Sommer	7,4	0-15	5	7,6	0-21	5	30,2	17-38	5	7,0	0-15	4
Herbst	2,7	0-8	6	1,5	0-4	6	13,8	0-31	6	5,0	0-12	7
Gesamt	5,5	0-22	16	4,1	0-21	14	23,8	0-40	14	7,1	0-18	14
Jahr 2011												
Winter	0	0-0	3	0,5	0-1	2	0	0-0	2	0	0-0	2
Frühjahr	8,0	0-30	6	6,4	0-18	7	17,7	0-33	6	5,3	0-12	6
Sommer	2,4	0-5	5	3	0-13	5	17,2	4-49	6	7,0	0-14	5
Herbst	0,4	0-2	7	1,6	0-3,4	7	3,4	0-9	7	2,1	0-7	8
Gesamt	3,0	0-30	21	3,4	0-18	21	11,1	0-49	21	4,0	0-14	21
Jahr 2012												
Winter	0	0-0	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Frühjahr	1,7	0-4	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Gesamt	0,7	0-4	7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Im Vergleich zu *D. reticulatus* wurden verhältnismäßig wenig *I. ricinus* geflaggt. Tabelle 19 gibt einen Überblick über die absoluten Zahlen aller gesammelten *I. ricinus* getrennt nach Standort und Jahr und stellt deren Verhältnis zu *D. reticulatus* dar. Demnach war *D. reticulatus* an allen vier Fangorten signifikant häufiger vertreten ($p < 0,001$ bis $p < 0,005$). Im Vergleich zu den übrigen Fangorten fiel jedoch der Standort Falkenberg durch einen höheren Anteil an *I. ricinus* Zecken auf (2010: 43,9 %; 2011: 27,4 %). Demgegenüber war *D. reticulatus* mit durchschnittlich 91,9 % (2010) bzw. 94,9 % (2011) an den verbleibenden Standorten dominierend. Bei Betrachtung der Speziesverteilung pro Jahr zeigte sich ebenfalls ein signifikant größerer Buntzeckenanteil in allen drei Jahren (jeweils $p < 0,001$). Demnach betrug der Anteil von *D. reticulatus* am Gesamtzeckenfang in den Jahren 2010 bis 2012 85,1 % ($n=3734$; 95 % KI: 83,9-86,2 %), 91,1 % ($n=5150$; 95 % KI: 90,3-91,9 %) bzw. 98,3 % ($n=302$; 95 % KI: 96,2-99,3 %). Im Gegensatz dazu waren jedoch innerhalb der einzelnen Saisons Unterschiede in der Speziesverteilung ersichtlich. Ursächlich waren unterschiedliche Aktivitätsmuster der beiden Zeckenspezies im Verlauf eines Jahres. Im Gegensatz zu dem bimodalen Auftreten von *D. reticulatus* wurde *I. ricinus* in Abhängigkeit vom Standort durchgängig von ca. März bis Mitte November geflaggt. Im Resultat war der

Ergebnisse

Anteil von *D. reticulatus* in der Herbstsaison (alle Orte und Jahre 2010/2011) mit durchschnittlich 96,7 % (95 % KI: 96,2-97,1 %) signifikant größer ($p < 0,001$). Entsprechendes galt für die Wintersaison, da hier nahezu keine *I. ricinus* gefunden wurden (99,8 %; 95 % KI: 98,96-99,97 %; $p < 0,001$). Im Umkehrschluss überwog *I. ricinus* in den Sommermonaten mit einem durchschnittlichen Anteil von 96,8 % (95 % KI: 94,7-98,1 %; $p < 0,001$). Ein ebenfalls signifikant höherer Anteil von *D. reticulatus* wurde mit Ausnahme des Standortes Falkenberg für die verbleibenden drei Orte in der Frühjahrsaison beobachtet. Letztere zeigten einen durchschnittlichen Buntzeckenanteil von 89,4 % (95 % KI: 87,9-90,7 %; $p < 0,001$). Am Standort Falkenberg konnte in der Frühjahrsaison keine Signifikanz nachgewiesen werden ($p = 0,626$), da in den Fangjahren die beiden Zeckenspezies in ihrer Verteilung deutlich variierten. Demnach war *I. ricinus* im Frühjahr 2010 mit einem Anteil von 77,9 % dominierend, 2011 lag hingegen der Anteil von *D. reticulatus* mit 63,1 % vergleichsweise hoch. Zur Veranschaulichung der Speziesverhältnisse innerhalb der einzelnen Saisons zeigt die Abb. 8 die prozentualen Anteile beider Zeckenspezies getrennt nach Standort und Jahr.

Tab. 19: Überblick zu den absoluten (n absol.) und relativen (n rel. %) Fangzahlen von *D. reticulatus* und *I. ricinus* unter Angabe der 95 % Konfidenzintervalle (KI). Die Zahlen basieren auf den nicht-normierten Daten. Die Indizes (^{a/b}) zeigen signifikante Unterschiede in den Prävalenzen an ($p \leq 0,001$).

	Jahr 2010			Jahr 2011		
	n absol.	n rel. (%)	95 % KI (%)	n absol.	n rel. (%)	95 % KI (%)
Güterfelde						
<i>D. reticulatus</i>	906	91,1 ^a	89,2-92,8	1359	95,6 ^a	94,4-96,5
<i>I. ricinus</i>	88	8,9 ^b	7,2-10,8	63	4,4 ^b	3,5-5,6
Gatow						
<i>D. reticulatus</i>	1214	95,4 ^a	94,2-96,5	1928	96,4 ^a	95,4-97,1
<i>I. ricinus</i>	58	4,6 ^b	3,5-5,8	73	3,6 ^b	2,9-4,6
Falkenberg						
<i>D. reticulatus</i>	400	56,1 ^a	52,4-59,7	629	72,6 ^a	69,6-75,5
<i>I. ricinus</i>	313	43,9 ^b	40,3-47,6	237	27,4 ^b	24,5-30,4
K. Wusterh.						
<i>D. reticulatus</i>	656	86,9 ^a	84,3-89,1	777	90,2 ^a	88,1-92,1
<i>I. ricinus</i>	99	13,1 ^b	10,9-15,7	84	9,8 ^b	7,9-11,9

Ergebnisse

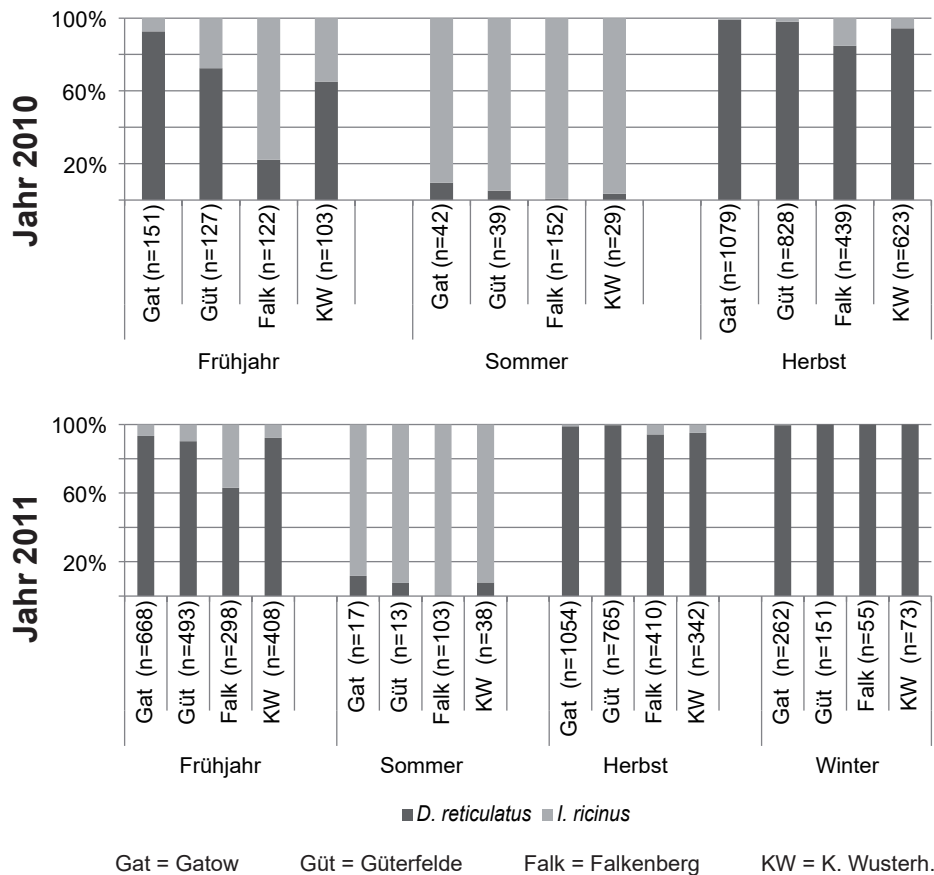


Abb. 8: Prozentuale Verteilung von *D. reticulatus* und *I. ricinus* innerhalb der Saisons Frühjahr bis Winter für alle Standorte im Jahr 2010 und 2011. Grundlage sind die nicht-normierten Sammeldaten. n = Gesamtzahl aus beiden Zeckenspezies

4.2 Erregeruntersuchungen

4.2.1 Etablierung der PCR zum Nachweis verschiedener Piroplasmen

4.2.1.1 Auswertung der PCR zum Nachweis der Partialsequenz im 18S rRNA Gen

Die anfänglich verwendete PCR zum Nachweis eines 383-447 bp großen Fragmentes des 18S rRNA Gens basierte auf der Veröffentlichung von Wielinga et al. (2009) und wurde zum gleichzeitigen Nachweis von *T. equi* und einer noch größeren Vielfalt verschiedener Babesien in den Primern und dem Reaktionsablauf modifiziert (Kapitel 9.2, Anhang). Das erstellte Alignment zeigte, dass theoretisch sämtliche in den Fokus genommenen Spezies mit den Primern nachweisbar sind. Folgende Sequenzen wurden überprüft: *B. canis* (GenBank Zugangsnummer EU152128.1), *B. vogeli* (HM590440.1), *B. cf. microti* (KM116006.1), *B. caballi* (Z15104.1), *B. major* (EU622907.1), *B. bigemina* (JQ723014.1), *B. bovis* (JQ723013.1), *B. divergens* (U16370.1), *B. motasi* (AY260180.1), *B. ovis* (AY260178.1), *B. capreoli* (KX839234.1), *B. venatorum* (KF724377.1), *B. microti*

(AB197940.1), *B. rossi* (JQ613104.1) und *T. equi* (KF559357.1). Eine Speziesdifferenzierung war anhand der erzeugten Fragmente möglich. Bei Verwendung der PCR wurden die zur Verfügung stehenden Plasmide von *B. rossi*, *B. microti* und *T. equi* erfolgreich amplifiziert. Die Modifizierung der Primer bewirkte jedoch eine erhöhte Unspezifität dieses Assays bei der Untersuchung der Feldproben. Demnach wurden Produkte verschiedener Pilze und Flechten erzeugt, die in der Gelelektrophorese in ihrer Größe nicht von den Babesienfragmenten zu unterscheiden waren. Die Überprüfung der erzeugten Sequenzen mit BLAST lieferte für folgende Spezies die höchsten Übereinstimmungen: Kontaminant I (*Xanthoria* spp., z. B. JQ301641.1), Kontaminanten II und V (*Cyathicula*-, *Ombrophila*- bzw. *Cudoniella* spp., z. B. EU940015.1, AY789364.1, AY789340.1), Kontaminanten III und IV (*Acremonium*-, *Sarocladium*- bzw. *Paecilomyces* spp., z. B. GQ867783.1, KC987205.1). Da eine weite Verbreitung dieser Umweltkontaminanten bei im Freiland gesammelten *D. reticulatus* anzunehmen war, wurde die PCR für diese Anwendung verworfen.

4.2.1.2 Auswertung der PCR zum Nachweis der ITS-1 Region von Babesien

4.2.1.2.1 Nachweisspektrum

Die vollkommen neu entwickelte PCR zum Nachweis der ITS-1 Region agierte im Vergleich zur vorangegangenen PCR spezifischer, ermöglichte aber lediglich den Nachweis eines kleineren Artenspektrums. Entsprechend des Alignments (Abb. 11, Kapitel 9.3) erlaubt die Verwendung des Primerpaares die Amplifikation des ITS-1-Abschnittes der für *D. reticulatus* bedeutenden Babesien (*B. canis*, *B. caballi*) sowie einer Vielzahl weiterer in Europa, vorwiegend in domestizierten Tieren beschriebenen Spezies dieser Gattung (*B. bigemina*, *B. major*, *B. venatorum*, *B. microti*, *B. divergens*, *B. vogeli*) (Deplazes et al. 2013a). Auch bei dieser PCR erfasste das Primerpaar den außerhalb Europas auftretenden Erreger *B. rossi*. Für *B. motasi*, *B. ovis*, *B. capreoli* und *T. equi* konnte die Übereinstimmung der Primer aufgrund inkomplett vorliegender publizierter Sequenzen nicht überprüft werden. Der Nachweis von *B. bovis* war aufgrund der Inkompatibilität des Rückwärtsprimers nicht möglich. Die erfolgreiche Amplifikation von Material von *B. canis*, *B. rossi* und *B. microti* wurde durch Anwendung der PCR bestätigt. *T. equi* konnte hingegen nicht amplifiziert werden, sodass sich diese PCR ausschließlich auf die Amplifikation der genannten Babesien beschränkt. Der Vergleich der Sequenzen im Alignment verdeutlichte Variationen in der Basenabfolge und in den erzeugten Fragmentlängen (333-499 bp), wodurch die Möglichkeit der Speziesdifferenzierung bestand. Durch die Untersuchung der isolierten Zecken-DNA konnte zudem eine erhöhte Spezifität der PCR ermittelt werden. Es wurden weder den Schlauchpilzen ähnelnde Fragmente, wie sie in der vorangegangenen PCR auftraten, noch anderweitige unspezifische Amplifikate gebildet.

4.2.1.2.2 Ergebnisse zur Optimierung der Reaktionsbedingungen

Im Vorfeld der eigentlichen Untersuchungen wurden die Reaktionsbedingungen und -komponenten optimiert. Die entsprechenden Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten erläutert. Die Aufführung des gesamten Reaktionsansatzes sowie der Reaktionsbedingungen erfolgte zum besseren Überblick bereits in Kapitel 3.2.5.2.

Festlegung der Annealing-Temperatur und der Polymerase

Die rechnerisch ermittelten Schmelztemperaturen der Primer lagen bei 72 °C (FP) und 70 °C (RP), wonach die Annealing-Temperatur theoretisch bei 67-69 °C angesetzt werden konnte. Die Plasmid-DNA von *B. microti* und *B. rossi* wurde unter Anwendung verschiedener Temperaturgradienten (65-75 °C) bei einer Annealing-Temperatur von 67 °C optimal amplifiziert. Darüber hinaus agierte die Maxima Hot Start *Taq* DNA Polymerase im Vergleich zur Phusion Hot Start II Polymerase weitaus sensitiver und vervielfältigte die Plasmid-DNA von *B. microti* und *B. rossi* jeweils in den Verdünnungsstufen 10^8 bis 10^1 .

Einstellung der $MgCl_2$ - und Primerkonzentration

Zur Optimierung der PCR wurden anschließend die Konzentrationen dieser Reaktionskomponenten variiert. Der Einsatz von 2 mM $MgCl_2$ zeigte sowohl bei den Plasmidpositivkontrollen als auch bei den gespikten Proben scharf umrissene und zuverlässig replizierbare Banden. Letztere Proben entsprachen isolierter Zecken-DNA, denen eine definierte Menge der Positivkontrolle zugesetzt wurde.

Unter Verwendung dieser $MgCl_2$ -Konzentration und einer Annealing-Temperatur von 67 °C wurde eine optimale Primerkonzentration von 0,4 μ M bestimmt.

Bestimmung der Sensitivität der PCR

Nach der erfolgreichen Einstellung der Reaktionskomponenten konnten bis zu 10 Kopien der reinen Plasmid-DNA (*B. microti*, *B. rossi*) nachgewiesen werden. Die Funktionsfähigkeit der PCR unter Realbedingungen wurde anschließend mithilfe verschiedener Reaktionsansätze, bei denen eine definierte Menge der Positivkontrollen zu den möglicherweise inhibitorisch wirkenden Zeckenisolaten hinzugefügt wurde, überprüft. In der Untersuchung der Einzelproben mit einem DNA-Gehalt von 60-120 ng/ μ l gelang der Nachweis von bis zu 10^1 (*B. microti*) bzw. 10^2 Kopien (*B. rossi*). Bei der Überprüfung der Zeckenpools wurden die zugesetzten Plasmidkopien bis zu einer Templatmenge von 2 μ l Zecken-DNA (60-120 ng/ μ l) zuverlässig amplifiziert (≤ 50 Kopien). Zugaben über diese Menge hinaus zeigten eine abnehmende Sensitivität.

4.2.2 Anzahl und Verteilung untersuchter *Dermacentor reticulatus*

Aus der Gesamtanzahl der 8166 gesammelten Buntzecken wurde eine Stichprobe von 2000 adulten weiblichen *D. reticulatus* auf verschiedene zeckenübertragene Erreger untersucht. Kapitel 3.2.3.1 zeigt die Bedingungen und die Formel zur Berechnung einer repräsentativen Anzahl zu untersuchender Zecken für jeden Fangtag pro Jahreshälfte. Während im Jahr 2011 die angestrebte Gesamtanzahl von 125 zu analysierenden Zecken pro Jahreshälfte an allen vier Fangorten vorhanden war, wich die Anzahl der zur Verfügung stehenden Buntzecken im Jahr 2010 aufgrund des späten Studienbeginns und zu geringer Fangwerte in der ersten Jahreshälfte davon ab. Einen Überblick über die im Endeffekt für jede Jahreshälfte und für jeden Standort untersuchte Anzahl von *D. reticulatus* liefert Tab. 20. Detaillierte Informationen für die einzelnen Fangtage sind hingegen in Tab. 24 bis Tab. 27 (Anhang) aufgeführt.

Tab. 20: Überblick zur Anzahl untersuchter *D. reticulatus* aus allen gesammelten weiblichen Buntzecken

Standort	Jahr 2010				Jahr 2011			
	n untersucht (n gesammelt)				n untersucht (n gesammelt)			
	Jahreshälfte I		Jahreshälfte II		Jahreshälfte I		Jahreshälfte II	
Güterfelde	91	(91)	165	(461)	125	(362)	125	(416)
Gatow	89	(89)	167	(580)	125	(524)	125	(571)
Falkenberg	15	(15)	216	(216)	125	(153)	125	(228)
K. Wusterh.	50	(50)	207	(332)	125	(279)	125	(176)

4.2.3 Prävalenzen

4.2.3.1 *Babesia* spp.

Vertreter der Babesien wurden mithilfe einer PCR zum Nachweis eines 333-499 bp großen Fragmentes der ITS-1 Region untersucht. Diese in Form von Pools durchgeführten Untersuchungen zeigten Banden der entsprechenden Größe in vier Pools. Die Kontrolle durch Analyse der im Pool vereinten Einzelzecken konnte den Hinweis auf eine Babesien-Infektion jedoch in keinem Fall bestätigen. Demnach waren sämtliche der 2000 analysierten *D. reticulatus* in Bezug auf eine Infektion mit Babesien negativ (0 %; 95 % KI: 0-0,14 %).

4.2.3.2 *Borrelia* spp.

Die Bestimmung der Prävalenz verschiedener Borrelien erfolgte durch Detektion eines Fragmentes in der 5S-23S rRNA IGS-Region mithilfe zweier verschiedener PCR-Verfahren. Die vorangeschaltete konventionelle PCR agierte vergleichsweise unspezifisch und wurde durch Anwendung einer real-time PCR, welche das gesuchte Gensegment mithilfe einer Sonde detektiert, überprüft. Im Ergebnis wurde in fünf der insgesamt 2000 einzeln untersuchten Zecken ein den Borrelien entsprechendes 67 bp großes Fragment nachgewiesen (0,25 %; 95 % KI: 0,11-0,58 %) (Tab. 21). Die Funde stammen von allen vier Standorten und die Prävalenzen erreichten Werte von 0,2 % (Gatow, Güterfelde; 95 % KI: 0,03-1,1 %), 0,21 % (Falkenberg; 95 % KI: 0,04-1,17 %) bzw. 0,39 % (K. Wusterh.; 95 % KI: 0,11-1,43 %). Mit 0,2 % (2010; 95 % KI: 0,05-0,73 %) und 0,3 % (2011; 95 % KI: 0,1-0,88 %) waren die Prävalenzen zwischen den Jahren nahezu identisch. Nach Amplifikation des 153 bp großen Fragmentes des *hbb* Gens gelang die Bestimmung der Genospezies bei zwei der fünf positiven Proben mittels Sequenzierung. Eine Probe entsprach zu 100 % der Sequenz von *B. miyamotoi*, welche bereits aus *I. ricinus* und *I. hexagonus* in Deutschland isoliert wurde (GenBank Zugangsnummer HE993870.1) (Schreiber et al. 2014). Die zweite Probe war 100 % identisch zu verschiedenen Isolaten von *B. afzelii* (GenBank Zugangsnummer CP009212.1). Aufgrund der niedrigen Prävalenzen und den stark überlappenden 95 % Konfidenzintervallen wurde auf eine vergleichende statistische Auswertung auf signifikante Unterschiede verzichtet.

Tab. 21: Borrelien-Prävalenzen in *D. reticulatus* mit Angabe der 95 % Konfidenzintervalle (KI)

	Güterfelde	Gatow	Falkenberg	K. Wusterh.
Jahr 2010				
Anzahl positiv/untersucht	1/256	0/256	1/231	0/257
Prävalenz	0,39 %	0 %	0,43 %	0 %
95 % KI	0,07-2,18 %	0,0-1,05 %	0,08-2,41 %	0,0-1,04 %
Jahr 2011				
Anzahl positiv/untersucht	0/250	1/250	0/250	2/250
Prävalenz	0 %	0,4 %	0 %	0,8 %
95 % KI	0,0-1,07 %	0,07-2,23 %	0,0-1,07 %	0,22-2,87 %

4.2.3.3 Anaplasmataceae

In Bezug auf den Nachweis verschiedener Anaplasmataceae wurde *D. reticulatus* in Form von Pools, jeweils bestehend aus der DNA von fünf Zecken, analysiert. Innerhalb dieser Familie wurde der Fokus der Untersuchung auf Vertreter der Anaplasmen und Ehrlichien

Ergebnisse

sowie auf *Cand. Neoehrlichia mikurensis* gelegt. Die gemeinsame PCR zum Nachweis der Erreger basierte auf der Detektion eines 257 bp großen Fragmentes des 16S rRNA Gens. Zunächst zeigten sechs Pools Banden der entsprechenden Größe in der Gelelektrophorese. Die separate Untersuchung aller poolbildenden Zecken in einem weiteren PCR-Durchlauf sowie in der HRM verifizierte eine Infektion jedoch bei nur einer einzigen Zecke. Damit betrug die Prävalenz in den 2000 untersuchten Zecken 0,05 % (95 % KI: 0,01-0,28 %) (Tab. 22). Der Fund der positiv getesteten Zecke stammte aus dem Fangort Falkenberg (2010). Die Sequenzierung des amplifizierten Materials zeigte mit 99 % die höchsten Übereinstimmungen mit den Spezies *A. phagocytophilum* (GenBank Zugangsnummer AY055469.3) und *A. platys* (GenBank Zugangsnummer EF139459.1). Da in Deutschland bislang kein Vorkommen von *A. platys* beschrieben wurde, war davon auszugehen, dass es sich bei der Sequenz um *A. phagocytophilum* handelte.

In den Untersuchungen wurden weder Ehrlichien noch *Cand. Neoehrlichia mikurensis* nachgewiesen (0 %; 95 % KI: 0-0,14 %).

Tab. 22: Prävalenzen von *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. und *Cand. Neoehrlichia mikurensis* in *D. reticulatus* mit Angabe der 95 % Konfidenzintervalle (KI)

	Güterfelde	Gatow	Falkenberg	K. Wusterh.
Jahr 2010				
Anzahl positiv/untersucht	0/256	0/256	1/231 ^{a)}	0/257
Prävalenz	0 %	0 %	0,43 %	0 %
95 % KI	0,0-1,05 %	0,0-1,05 %	0,08-2,41 %	0,0-1,04 %
Jahr 2011				
Anzahl positiv/untersucht	0/250	0/250	0/250	0/250
Prävalenz	0 %	0 %	0 %	0 %
95 % KI	0,0-1,07 %	0,0-1,07 %	0,0-1,07 %	0,0-1,07 %

^{a)} *Anaplasma* sp.

4.2.3.4 *Rickettsia* spp.

4.2.3.4.1 Prävalenzen

Aufgrund hoher erwarteter Prävalenzen wurden die 2000 Buntzecken einzeln auf eine Infektion mit Rickettsien untersucht. In einer vorangeschalteten PCR, welche ein 203 bp großes Fragment des *gltA*-Gens amplifizierte, zeigten 1280 (64,0 %; 95 % KI: 61,9-66,1 %) Zecken positive Banden. Sämtliche nach Fangort, Jahr und Saison getrennten Prävalenzen sind in Tab. 23 aufgeführt. Die Durchschnittsprävalenzen in den verschiedenen Untersuchungsjahren waren nahezu identisch (2010: 63,0 %; 2011: 65,0 %; Mid-P Exakt

Ergebnisse

Test $p=0,35$). Im Gegensatz dazu zeigten die Standorte große Differenzen in der Anzahl Rickettsien-infizierter Buntzecken. Demnach waren die in Gatow ermittelten Prävalenzen mit 28,5 % (2010) bzw. 34,4 % (2011) signifikant niedriger als in den verbleibenden drei Standorten (2010: 71,9-77,0 %; 2011: 71,2-81,2 %; beide Jahre jeweils Mid-P Exakt Test, p-Werte korrigiert nach Holm: $p<0,001$). Darüber hinaus wurden 2011 am Standort Falkenberg im Vergleich zu Güterfelde weniger Rickettsien-infizierte Buntzecken ermittelt (Mid-P Exakt Test korrigiert nach Holm: $p<0,05$). Die folgenden Betrachtungen kleinerer Zeitfenster im Jahresverlauf zeigten keine signifikanten Unterschiede in den Prävalenzen. Gemäß der ursprünglichen Aufteilung in zwei Jahreshälften betrug die Infektionsraten an allen Standorten zusammen in der ersten Jahreshälfte in 2010 57,6 % ($n=245$) und in der zweiten 64,8 % ($n=755$). In 2011 erreichten die Prävalenzen 62,8 % ($n=500$) in der ersten bzw. 67,2 % ($n=500$) in der zweiten Jahreshälfte. Die nach Abschluss der Zeckensammlung sinnvoller erscheinende Aufteilung nach Saisons ähnelte in ihren Ergebnissen der ursprünglichen Einteilung, da die zeckenreichen Saisons Frühjahr und Herbst mit 627 bzw. 1255 Exemplaren den Großteil der Zecken der beiden Jahreshälften ausmachten. Demnach waren in den Frühjahrsmonaten (alle Standorte zusammen) 57,8 % ($n=244$; 2010) bzw. 61,6 % ($n=383$; 2011) der untersuchten *D. reticulatus* mit Rickettsien infiziert. Dagegen lagen die durchschnittlichen Prävalenzen mit 64,8 % ($n=755$; 2010) und 67,2 % ($n=500$; 2011) in den Herbstmonaten um 5,6-6,9 % höher als im Frühjahr. Bei Betrachtung der einzelnen Standorte war jedoch kein einheitliches Prävalenzmuster beim Vergleich dieser beiden Saisons erkennbar. Auf die verbleibenden Saisons Sommer und Winter entfielen insgesamt 118 untersuchte Zecken, wobei in den Sommermonaten mit lediglich fünf *D. reticulatus* eine zu vernachlässigende Stichprobe vorhanden war. In den Wintermonaten 2010/2011 lag die durchschnittliche Rate Rickettsien-infizierter Buntzecken bei 66,4 %. Paarweise statistische Tests zwischen allen vier Saisons (Durchschnitt aller Standorte) verdeutlichten fehlende signifikante Unterschiede sowohl für das Untersuchungsjahr 2010 als auch für 2011 (paarweise Mid-P Exakt Tests, p-Werte korrigiert nach Holm: $p=0,15$ bis $p=1,0$).

Zur Bestimmung der Genospezies wurden 18 aus den vier Fangorten ausgewählte Proben in einer zweiten PCR untersucht, welche ein 676 bp großes Fragment des *gltA*-Gens vervielfältigte und aufgrund der längeren Sequenz bessere Differenzierungsmöglichkeiten zwischen nahe verwandten *Rickettsia* spp. ermöglichte. Die Sequenzierung des amplifizierten Materials zeigte bei allen 18 Zecken eine 100%ige Übereinstimmung mit verschiedenen Isolaten von *R. raoultii* (u. a. GenBank Zugangsnummer KT261764.1).

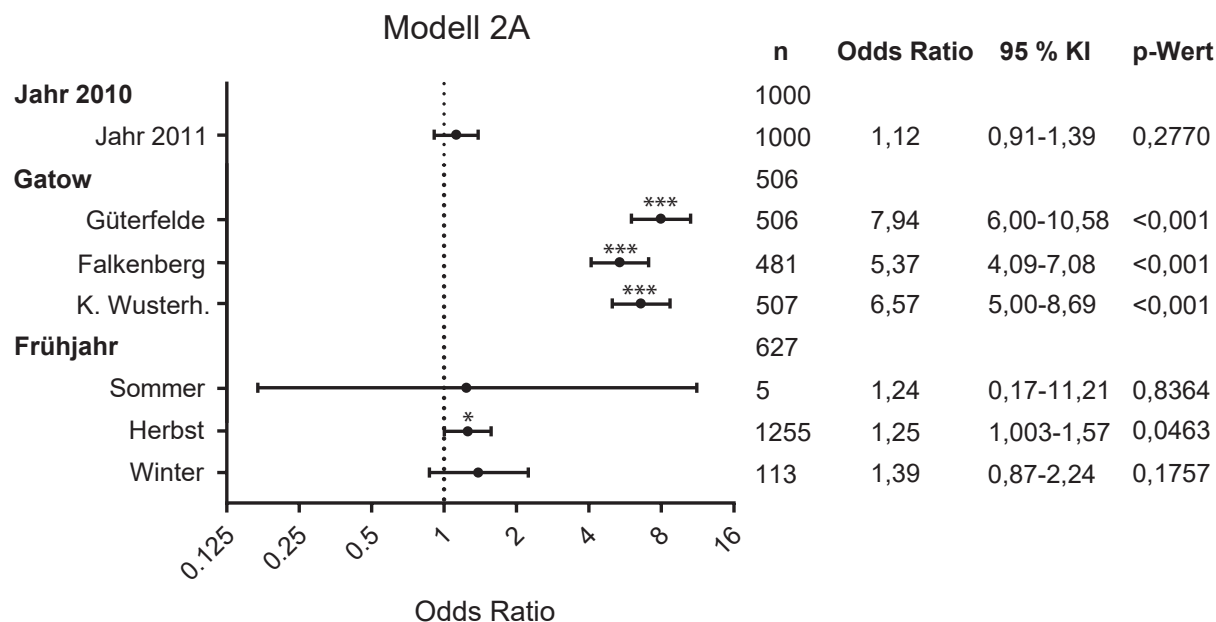
Ergebnisse

Tab. 23: Prävalenzen von *Rickettsia* spp. in *D. reticulatus* in Bezug auf Fangort, Jahr und Saison unter Angabe der 95 % Konfidenzintervalle (KI). Unterschiedliche Indizes (^{a-c}) verdeutlichen signifikante Prävalenzunterschiede zwischen den Fangorten in beiden Jahren ($p < 0,05$).

	Güterfelde	Gatow	Falkenberg	K. Wusterh.
Positive Zecken/Gesamtzahl untersuchter Zecken				
Prävalenz in % (95 % KI)				
Jahr 2010				
Gesamt	193/256 75,4 (69,8-80,3) ^a	73/256 28,5 (23,3-34,3) ^b	166/231 71,9 (65,7-77,3) ^a	198/257 77,0 (71,5-81,8) ^a
Frühjahr	59/91 64,8 (54,6-73,9)	29/88 33,0 (24,0-43,3)	11/15 73,3 (48,0-89,1)	42/50 84,0 (71,5-91,7)
Sommer	0/0 -	0/1 0 (0,0-73,0)	0/0 -	0/0 -
Herbst	134/165 81,2 (74,6-86,4)	44/167 26,3 (20,3-33,5)	155/216 71,8 (65,4-77,3)	156/207 75,4 (69,1-80,7)
Jahr 2011				
Gesamt	203/250 81,2 (75,9-85,6) ^a	86/250 34,4 (28,8-40,5) ^c	178/250 71,2 (65,3-76,5) ^b	183/250 73,2 (67,4-78,3) ^{ab}
Frühjahr	74/92 80,4 (71,2-87,3)	19/90 21,1 (14,0-30,6)	76/101 75,2 (66,0-82,6)	67/100 67,0 (57,3-75,4)
Sommer	1/1 100 (27,0-100)	0/1 0 (0,0-73,0)	0/0 -	2/2 100 (42,5-100)
Herbst	104/125 83,2 (75,7-88,7)	53/125 42,4 (34,1-51,2)	83/125 66,4 (57,7-74,1)	96/125 76,8 (68,7-83,3)
Winter	24/32 75,0 (57,9-86,7)	14/34 41,2 (26,4-57,8)	19/24 79,2 (59,5-90,8)	18/23 78,3 (58,1-90,3)

4.2.3.4.2 Logistische Regression zur Beurteilung der Bedeutung verschiedener Parameter für die Rickettsien-Prävalenz

Um mögliche Einflüsse der Variablen Fangort, Jahr und Saison auf die Infektionsrate von *D. reticulatus* mit *Rickettsia* spp. gleichzeitig zu betrachten, wurden die Daten in einem generalisierten linearen Modell mittels logistischer Regression zusammen untersucht. Das daraus hervorgehende Grundmodell (Modell 2A) ist in Abb. 9 dargestellt.



Wald-Test (p-Werte): Fangort (<0,001), Jahr (0,28), Saison (0,19)

AIC: 2313,5

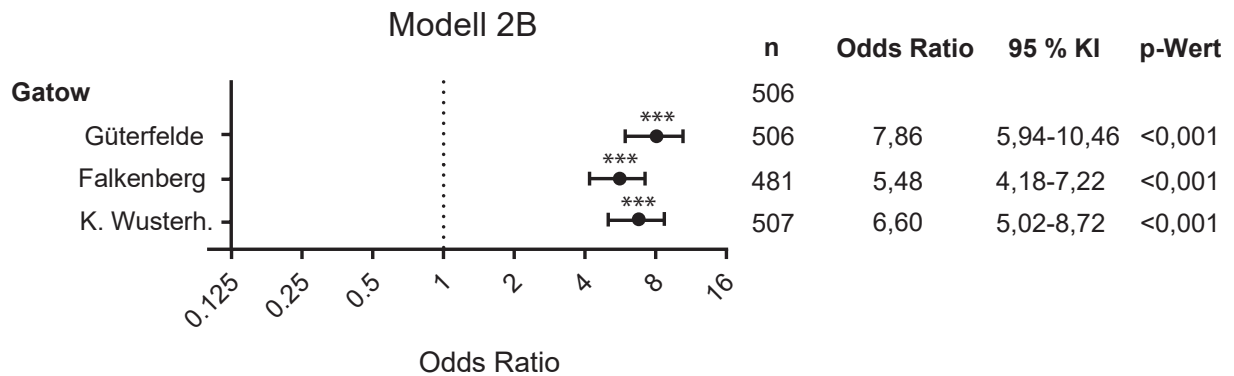
R²: Nagelkerke 0,200/ Mc Fadden 0,121

Abb. 9: Forestplot zu dem in der logistischen Regressionsanalyse erstellten Grundmodell 2A zur Beurteilung möglicher Einflussfaktoren auf die Rickettsien-Prävalenz in *D. reticulatus* unter Angabe der Odds Ratios, 95 % Konfidenzintervalle und p-Werte. Es wurden die Referenzkategorien Gatow, Jahr 2010 und Saison Frühjahr gegen die verbleibenden Level aus Standort, Jahr und Saison getestet. n = Anzahl untersuchter Zecken

Die Optimierung dieses Modells wurde durch die Elimination der Parameter Jahr und Saison, welche durch ihren fehlenden bzw. schwach signifikanten Einfluss weder das Modell verbesserten (AIC) noch einen signifikanten Einfluss als Faktor (Wald Test) hatten, erreicht. Als Resultat beinhaltet das Beste Modell (Modell 2B) ausschließlich den Parameter Fangort (Abb. 10). Der Vergleich beider Modelle zeigte eine Verbesserung des AIC um 2,4 Punkte. Das Pseudo-R² nach McFadden und Nagelkerke war in beiden Modellen nahezu gleich. Der signifikante Unterschied zum Nullmodell bewies die Güte des Modells. Im Ergebnis verdeutlichte das Beste Modell eine signifikant geringere Infektionswahrscheinlichkeit von

Ergebnisse

D. reticulatus mit Rickettsien in Gatow im Vergleich zu den drei verbleibenden Fangorten (jeweils $p < 0,001$). Gemessen am Fangort Gatow, war die Wahrscheinlichkeit infizierte Buntzecken zu finden (Odds) an den anderen Standorten 5,48-mal (Falkenberg), 6,6-mal (K. Wusterh.) bzw. 7,86-mal (Güterfelde) höher.



AIC: 2311,1

R²: Nagelkerke 0,197/ Mc Fadden 0,119

Abb. 10: Forestplot zu dem in der logistischen Regressionsanalyse erstellten Besten Model 2B zur Beurteilung möglicher Einflussfaktoren auf die Rickettsien-Prävalenz in *D. reticulatus* unter Angabe der Odds Ratios, 95 % Konfidenzintervalle und p-Werte. Ausschließlich der Standort hat einen signifikanten Einfluss. Die Referenzkategorie Gatow wurde gegen die verbleibenden Standorte Güterfelde, Falkenberg und K. Wusterh. getestet. n = Anzahl untersuchter Zecken

5 Diskussion

Zeckenübertragene Erkrankungen stellen einen wichtigen Bereich der Infektionsmedizin sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin dar. Die Arten und Prävalenzen von in den Zecken befindlichen Erregern, aber auch das Vorkommen und die Aktivität verschiedener Zeckenspezies selbst, variieren in Abhängigkeit von der geografischen Region und unterliegen darüber hinaus einem stetigen Wandel. Die vorliegende Studie liefert umfassende Untersuchungen zum Aktivitätsverhalten adulter *D. reticulatus* im Jahresverlauf in Berlin und dem angrenzenden Umland und untersucht die aktuelle Situation zur Erregerlast (Babesien, Borrelien, verschiedene Anaplasmataceae, Rickettsien) in den Zecken. Darüber hinaus wurden Abhängigkeiten zwischen der Aktivität der Buntzecken bzw. der Rickettsienprävalenz und verschiedenen abiotischen Faktoren bestimmt.

Die dabei erzielten Ergebnisse werden im Folgenden zunächst unter dem Gesichtspunkt der für das Sammeln und Untersuchen der Zecken verwendeten Methoden beleuchtet. Im Anschluss werden die Beobachtungen zur Aktivität von *D. reticulatus* und potentiell auf diese Einfluss nehmende Faktoren diskutiert. Zuletzt werden die Prävalenzen der untersuchten Erreger mit den Ergebnissen anderer Publikationen verglichen und die hier erzielten Ergebnisse unter dem Aspekt ihrer human- und tiermedizinischen Relevanz erörtert.

5.1 Untersuchungsmethoden

5.1.1 Flaggen von Zecken

Die Fahnen-Flaggen-Methode

Die im Rahmen dieser Studie verwendete Fahnen-Flaggen-Methode gilt als effektives Verfahren zum Sammeln wirtssuchender adulter Buntzecken (Martinod und Gilot 1991) und wird in der Literatur immer wieder als Fangmethode angegeben (Beelitz et al. 2012, Radzijeuskaja et al. 2015, Wójcik-Fatla et al. 2015). Die Effektivität anderer Fangverfahren zum Sammeln adulter *D. reticulatus* wurde bislang kaum untersucht. Die Wahl des Fangverfahrens sollte jedoch grundsätzlich in Abhängigkeit von der Zeckenspezies erfolgen, da diese äußerst unterschiedlich auf die verschiedenen Verfahren ansprechen. Daneben sind das Entwicklungsstadium, ihre Reizfaktoren, das Wirtssuchverhalten und die zu erwartenden Aktivitätszeiten sowie Habitatsstrukturen und bestehende Wetterverhältnisse von Bedeutung (Schulze et al. 1997, Tack et al. 2011, Dantas-Torres et al. 2013, Mays et al. 2016). Vom Prinzip her nahezu identische Verfahren wie das Walking (Ginsberg und Ewing 1989) bzw. Dragging (Dantas-Torres et al. 2013, Rulison et al. 2013) sind eher zum Fangen kleinerer Zeckenzahlen bzw. zum Beprobieren bodennaher Vegetationsschichten geeignet.

Eine konstante CO₂-Benetzung technisch modifizierter Flaggen (Gherman et al. 2012) bewirkt keine signifikante Verbesserung gegenüber der konventionellen Flagge (Mays et al. 2016). Auch der Vergleich der Zeckenaktivität auf Basis duftstoffversetzter Flaggen (Fourie et al. 1995) besitzt vermutlich nur eingeschränkte Aussagekraft, da die Konzentration der Wirtsgerüche zum einen schwer standardisierbar und zum anderen stark anfällig gegenüber Wetterbedingungen (feuchte Vegetation, Wind) ist. Nachteiligerweise wird die Effektivität der Flaggen-Methode, wie auch die der anderen Fangmethoden, ebenfalls durch bestehende Witterungsverhältnisse beeinflusst (Gray 1985, Schulze et al. 1997). Somit wurde in dieser Studie das Flaggen bei tau- oder regennasser bzw. schneebedeckter Vegetation eingestellt, da sich die Mikrofaserstruktur der Flagge verändert und die Zecken womöglich schlechter anhaften können. Auch starker Wind erschwerte das Sammeln. Darüber hinaus bergen diese Verfahren, bei denen Zecken von der Vegetation abgestreift werden, das Risiko bereits anhaftende Exemplare durch einen sehr dichten Pflanzenwuchs oder schlechten Untergrund frühzeitig zu verlieren und damit das Zeckenaufkommen zu unterschätzen (Tack et al. 2011). Um die Gefahr des Drop-offs zu minimieren, wurde die Flagge alle 10-20 Schritte abgesammelt. Li und Dunley (1998) bestätigen in ihren Untersuchungen die immense Bedeutung kurzer Absammelintervalle. Fest stationierte Trockeneisfallen, welche auf Basis der Chemotaxis Zecken durch die Emission von CO₂ anlocken, können die mit dichter Vegetation einhergehenden Probleme aller bislang genannten Verfahren umgehen. Immler (1973) bewies damit sogar das Fangen juveniler *D. reticulatus*, zeigte aber auch bedeutend geringere Fangergebnisse der im Fokus stehenden adulten Exemplare im Vergleich zur Fahnen-Flaggen-Methode. Die Ursache liegt in der Wirtspräferenz und dem damit verbundenen Aufenthaltsort in der Vegetation. Aufgrund kleiner Bewegungsradien der Zecken wird diese logistisch und finanziell aufwendige Methode jedoch ausschließlich für kleine Fangflächen empfohlen und war daher für die aktuelle Studie ungeeignet (Gray 1985, Kinzer et al. 1990, Schulze et al. 1997).

Vorgehensweise beim Flaggen

In den Untersuchungen wurde an jedem Standort zwar ein festes Wegenetz beprobt, in Analogie zu anderen Studien wurde die Zeckenaktivität jedoch in Abhängigkeit von der Zeit (1 Stunde) dokumentiert (Bartosik et al. 2011, Chitimia-Dobler 2015). Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da ausschließlich schmale Wege (Flaggenbreite) beprobt wurden. Dadurch sollte eine Migration der Zecken aus angrenzenden Vegetationsschichten ermöglicht werden und einer potentiellen Reduktion der Zeckenzahl durch wiederholtes Beflaggen ein und derselben Fläche vorgebeugt werden. Da jedoch die Bestimmung der jeweiligen Gesamtfläche aufgrund der Wegverläufe schwierig war, konnte das von Estrada-Peña et al. (2013b) propagierte Fangen von Zecken auf definierten Flächen zur Bestimmung der

Zeckendichte nicht umgesetzt werden. Mit Ablauf der Stunde traten durchaus geringgradige Variationen in der zurückgelegten Strecke an den Standorten auf. In diesem Zusammenhang ist der Zeitaufwand zu berücksichtigen, der für das Absammeln der Zecken von der Flagge benötigt wurde und welcher mit einer zunehmenden Anzahl festhaftender Zecken stieg. Das Einsammeln einer Buntzecke dauerte im Durchschnitt lediglich 1,6 sec, da diese aufgrund ihrer Größe und Farbgebung gut auf der Flagge zu erkennen und zu greifen war. Der überwiegende Teil der gesammelten Zecken entsprach *D. reticulatus*, wobei im Durchschnitt 55 Buntzecken/h geflaggt wurden. Im Vergleich zu Tagen an denen keine Zecken gefunden wurden, wurde damit 1,5 min pro Stunde weniger Zeit mit dem aktiven Flaggen verbracht. An Tagen mit der maximalen Fangzahl von 270 Buntzecken/h ergab sich ein Zeitverlust von 5,5 min gegenüber dem Durchschnittstag. Die Reduktion der aktiven Fangzeit und Fangstrecke führt möglicherweise zur Unterschätzung der Anzahl aktiver Zecken an zeckenreichen Tagen. Aufgrund der identischen Vorgehensweise an allen Fangorten und -tagen blieb jedoch die Vergleichbarkeit der Standorte untereinander gewährleistet. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Unterschiede der Saisons Frühjahr und Herbst, welche sich durch hohe Buntzeckenaktivitäten auszeichneten, zu dem zeckenarmen Sommer stärker ausgeprägt sind als von den Daten wiedergegeben wird. Zur Verbesserung dieser Methode sollte daher ausschließlich die Zeit in Bewegung in die Dichteberechnungen einfließen.

Die Beprobungszeitpunkte variierten im Tagesverlauf in Abhängigkeit von der Saison und den damit verbundenen Tageslängen und Wetterbedingungen. Während in den Sommermonaten in den Morgen- und Abendstunden geflaggt wurde, erfolgte die Probenahme in den verbleibenden Saisons vorwiegend im Zeitraum zwischen 11 und 15 Uhr. Inwieweit *D. reticulatus* einen zirkadianen Rhythmus verfolgt und damit die Fangergebnisse damit beeinflusst, ist nicht ausreichend geklärt. Immler (1973) verfolgte während eines 30-Tage-Experiments im Oktober die vertikalen Bewegungen adulter *D. reticulatus* in einem künstlichen Freilandmikrohabitat und schlussfolgerte, dass die Zecken nach einer dreitägigen, vorwiegend nachts stattfindenden Bewegungsphase bis zum Verlassen der Pflanze ab Tag 20 kaum ihre Position änderten. Lane et al. (1985) beschrieben anhand von *Dermacentor occidentalis* ebenfalls wenige und ausschließlich nachts stattfindende vertikale Bewegungen. Im Gegensatz dazu lassen die Untersuchungen von Bartosik et al. (2012) ein tageszeitliches Aktivitätsmuster mit Maximalwerten um 14 Uhr vermuten, wobei das Ergebnis bei keinem der untersuchten Sammelzeitpunkte signifikant war.

Bei jeder Beprobung wurden sämtliche geflaggtten Zecken dem Habitat entnommen. In Abhängigkeit von der Fangfrequenz und der Populationsgröße ist grundsätzlich eine

Verminderung der Zeckenpopulation durch stetiges Sammeln in ein und demselben Habitat vorstellbar. Bedingt dadurch, dass während des Flaggens nur ein Bruchteil der Gesamtpopulation aktiv ist (Estrada-Peña et al. 2013b), wäre eine Minimierung der Zeckenzahl erst nach zahlreichen Fangterminen zu erwarten. Kramer et al. (1993) zeigten in einem dreimonatigen Capture-Recapture-Versuch anhand von markierten *I. pacificus* (n=178) einen mit fortschreitenden Fangterminen zunehmend höheren Anteil an bereits zuvor geflaggtten Zecken am Gesamtzeckenfang und befürchten einen Populationsrückgang und eine damit verbundene Verfälschung der ermittelten Zeckenzahlen bei Langzeitstudien. Lane et al. (1985) beobachteten bei 7 Probennahmen innerhalb einer sechswöchigen Fangperiode jedoch eine stabile Population von *D. occidentalis*. Im Rahmen dieser Studie wurde im Herbst 2011 an den Standorten Güterfelde, Gatow und Falkenberg (K. Wusterh. nicht beurteilbar aufgrund des Flächenwechsels) tatsächlich ein Rückgang der durchschnittlichen Fangzahl an Buntzecken/h um jeweils 20 % im Vergleich zum Vorjahr beobachtet. Auch die Anzahl gesammelter *I. ricinus* zeigte tendenziell eine Abnahme an diesen Standorten. Im Durchschnitt wurden im Sommer 46 % und im Herbst 70 % weniger *I. ricinus*/h gesammelt als in der jeweiligen Saison des Vorjahres. Der Vergleich anderer Saisons war aufgrund der Datenlage nicht möglich. Aussagen zur Entnahme der Zecken als Ursache des Populationsrückgangs können dennoch nicht getroffen werden, da die vorhandenen biotischen und abiotischen Faktoren zwischen den beiden Jahren möglicherweise diese Entwicklung herbeiführten. Darüber hinaus wurde in der Negativ-Binomial-Regressionsanalyse kein signifikanter Unterschied in den Aktivitäten von *D. reticulatus* zwischen den Jahren 2010 und 2011 festgestellt. Hinzu kommt, dass an allen Standorten nur schmale Wege (Flaggenbreite: 0,50 m) beprobt wurden, wodurch Migrationsbewegungen aus der direkten Umgebung möglich sein sollten. Immerhin zeigten Buczek et al. (2017) in einem jüngsten, über 7 Wochen andauernden experimentellen Feldversuch horizontale Bewegungen von $66,35 \pm 100$ cm (Weibchen) bzw. $54,85 \pm 45$ cm (Männchen) anhand adulter markierter Buntzecken. Zusammen mit dem Nachschub adulter Stadien durch die Weiterentwicklung der Nymphen im Spätsommer gleichen Migrationsbewegungen die beim Sammeln entstehenden Differenzen möglicherweise wieder aus. Generell wären jedoch Studien, welche einen Vergleich zwischen Entnahme- und Nicht-Entnahme-Versuchen über längere Zeiträume dokumentieren, notwendig, um abzuklären, inwieweit die Entnahme von Zecken die Population beeinflusst.

5.1.2 Identifikation von *Dermacentor reticulatus*

Mithilfe der Stereomikroskopie wurde die Bestimmung der Zeckenspezies vorgenommen, wobei diese insbesondere zur Abgrenzung der ebenfalls in Deutschland beheimateten und morphologisch überaus ähnlichen Spezies *D. marginatus* verwendet wurde. Zahler et al. (1995) und Karger et al. (2012) befürchten fehlerhafte Zuordnungen zwischen nahe verwandten Zeckenspezies bei Verwendung der Mikroskopie. Molekularbiologische Verfahren, wie das MALDI-TOF (Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie) bzw. eine PCR zum Nachweis der ITS-2 Sequenz, sollen die Identifikation der Zeckenspezies verbessern (Zahler et al. 1995, Karger et al. 2012, Yssouf et al. 2013). Olivieri et al. (2016) zeigten hingegen identische Ergebnisse in der Identifizierung der Buntzeckenspezies bei Verwendung mikroskopischer bzw. molekularbiologischer Untersuchungsmethoden (PCR: mitochondriale 12S rRNA-, 16S rRNA-, *cox1*-Gene). Die zuletzt dokumentierte Verbreitung von *D. marginatus* zwischen dem 33. und 51. Breitengrad (Rubel et al. 2016) bekräftigt zudem die Richtigkeit der aktuellen Untersuchungen. Der nördlichste Fund von *D. marginatus* in Deutschland und ganz Europa befindet sich bis heute im Gebiet von Wetzlar und Gießen und erreicht damit nicht den Berliner Raum (Liebisch und Rahman 1976, Rubel et al. 2016).

5.1.3 Screening ausschließlich weiblicher *Dermacentor reticulatus*

Die Analyse der Zecken auf die verschiedenen Erreger wurde ausschließlich an weiblichen *D. reticulatus* durchgeführt, da weiblichen Vertretern der Ordnung Ixodida generell eine größere Bedeutung durch ein höheres Übertragungsrisiko von Pathogenen zugesprochen wird (Stich et al. 2008). Als Hauptgrund ist das intensivere Saugverhalten weiblicher Zecken zu nennen. Weibliche Buntzecken nehmen bis zu zehnmal größere Blutvolumina während des Saugaktes auf und geben zeitgleich größere Mengen potentiell infektiösen Speichels an den Wirt ab (Immler 1973, Stich et al. 2008). Von entscheidender Bedeutung ist die Saugdauer, da die Übertragung der in dieser Studie untersuchten Erreger erst mit einer Verzögerung von einigen Stunden bzw. Tagen einsetzt (Kapitel 2.2.1.2, 2.2.2.2.1, 2.2.3.2, 2.2.4 und 2.2.6.2). Diese Mindestzeiten werden durch eine 8-15 tägige Saugdauer weiblicher Buntzecken gewährleistet (Immler 1973). Darüber hinaus ist von einem größeren Infestationsrisiko durch weibliche Zecken auszugehen, da Weibchen in dieser und in einer Vielzahl weiterer Untersuchungen einen größeren Anteil an der Gesamtanzahl wirtssuchender Zecken ausmachten (Kapitel 4.1.3). Studien zur Analyse bereits wirtsgebundener Zecken zeigten zudem in der Mehrzahl der Fälle dominierende Anteile weiblicher *D. reticulatus* an den Wirtstieren (Hamel et al. 2013, Reye et al. 2013, Beck et al. 2014, Eichenberger et al. 2015, Ionita et al. 2016, Król et al. 2016a). Trotz der großen

Relevanz weiblicher Zecken sollten männliche Buntzecken nicht vollkommen außer Acht gelassen werden, da diese im Rahmen der Kopulation ebenfalls an Wirtsorganismen saugen, auch wenn sie mit einer Blutmenge von ungefähr 6,5 mg vergleichsweise wenig Blut (Weibchen: 330-530 mg) aufnehmen (Immler 1973). Tatsächlich wurde die intrastadiale Übertragung sowie die Vektorkompetenz für *A. marginale* durch männliche Exemplare bewiesen (Zivkovic et al. 2007, Hornok et al. 2012). Basierend auf einem humanen Erkrankungsfall, gehen Földvári et al. (2013) zudem von einer Transmission von *R. raoultii* auch durch männliche Buntzecken aus. Auch für *B. canis* wird die Weitergabe durch das intermittierende Saugverhalten männlicher *D. reticulatus* beschrieben (Heile et al. 2007, Varloud et al. 2018).

5.1.4 DNA-Isolationsverfahren

Die DNA-Isolation der Buntzecken aus dem Jahr 2010 wurde mit dem NucleoSpin 8 Blood Kit (MACHEREY-NAGEL) unter Verwendung des NucleoVac 96 Vacuum Manifold-Systems durchgeführt, die der Zecken aus dem Jahr 2011 hingegen mit dem Maxwell 16 LEV Blood DNA Kit (PROMEGA) im Maxwell 16 System (PROMEGA). Beide Verfahren wurden mit den dafür vorgesehenen Lysis-, Wasch- und Elutionspuffern durchgeführt.

Die gewonnene DNA entsprach bei nahezu allen Proben bei beiden Extraktionsverfahren dem erforderlichen Reinheitsgrad von 1,8-2 (Kapitel 3.2.3.3). Unterschiede hinsichtlich möglicher inhibitorischer Effekte ausgehend von den Zeckenisolaten der verschiedenen Extraktionsverfahren bei Durchführung der PCR liegen nicht vor, wie im Rahmen der Etablierung der PCR zum Nachweis der ITS-1 Sequenz der Babesien (Kapitel 3.2.5.2) festgestellt werden konnte. Demnach zeigte die Amplifikation von zugesetzten Plasmiden (*B. microti*, *B. rossi*) zu den extrahierten DNA-Proben aus den Jahren 2010 und 2011 die gleiche Sensitivität.

Entsprechend der photometrischen Messung in der Take3-Platte im Synergy 4 (BIOTEK) führte der Einsatz eines geringeren Elutionsvolumens (2010: 70 µl, 2011: 50 µl) zu durchschnittlich höheren DNA-Gehalten/µl in den Proben aus dem Jahr 2011. Durch die Verdünnung der Proben mit besonders hohen DNA-Konzentrationen im Vorfeld der PCR wurde jedoch sichergestellt, dass stets Proben mit einem DNA-Gehalt von ungefähr 60-120 ng/µl verwendet wurden.

5.1.5 PCR-Untersuchungen

In Prävalenzstudien haben molekularbiologische Verfahren zum spezifischen Nachweis von Erreger-DNA gegenüber der Mikroskopie, Immunfluoreszenz und dem Anzuchtverfahren weit größere Bedeutung erlangt und gelten in der Regel als Hauptuntersuchungsmethode. Die Standardverfahren molekularbiologischer Untersuchungen bilden die konventionelle PCR und die real-time PCR, welche beide, mit Gewichtung auf erstere, in dieser Studie angewandt wurden. Beide Verfahren ermöglichen die Bearbeitung großer Probenzahlen in vergleichsweise kurzer Zeit. Zudem erfordert die Auswertung der Ergebnisse im Gegensatz zu den zuvor genannten Verfahren keine besondere parasitologische Erfahrung durch den Untersucher. In Abhängigkeit von den Primersequenzen ist ein breites Spektrum nachweisbarer Spezies möglich. Voraussetzungen für den Untersuchungserfolg sind hohe sensitive und spezifische Eigenschaften des Assays um falsch-negative bzw. falsch-positive Ergebnisse zu verhindern.

Zum Nachweis von Babesien und Theilerien werden in der Literatur vorwiegend PCR-Verfahren zum Nachweis des 18S rRNA Gens beschrieben. Die in dieser Studie auf Basis dieses Genfragmentes zunächst durchgeführte PCR-Untersuchung wurde aufgrund des unspezifischen Verhaltens für die Anwendung an im Feld gesammelten *D. reticulatus* verworfen. Die von Grund auf neu designte PCR zum Nachweis der ITS-1 Region arbeitete hingegen höchst spezifisch und sensitiv (bis zu 10 Kopien). Im Vergleich zur vorangegangenen PCR mussten jedoch Abstriche in der Vielfalt nachzuweisender Piroplasmenspezies gemacht werden, worunter auch *T. equi* fiel. Der im Zusammenhang mit *D. reticulatus* beschriebene Erreger hat in Deutschland jedoch keine Relevanz. Dennoch war die Detektion aller für *D. reticulatus* relevanten Babesien als auch einer Vielzahl weiterer in Europa bedeutender Spezies möglich. Aufgrund der höheren Variabilität dieser Region bietet sie den Vorteil einer besseren Speziesdifferenzierung (Schnittger et al. 2012). Im Ergebnis wurde die Prävalenzbestimmung als auch die Speziesdifferenzierung auf Basis von nur einer PCR ermöglicht.

Zur Prävalenzbestimmung von Borrelien in *D. reticulatus* wurde eingangs ein Fragment der 5S-23S rRNA IGS-Region analysiert. Die angewandte konventionelle PCR verfügte zwar über eine hohe Sensitivität (10 Kopien), bildete jedoch gelegentlich unspezifische Produkte. Scheinbar positive Proben wurden mithilfe einer von Strube et al. (2010) etablierten real-time PCR überprüft. Die damit einhergehende doppelte Probenuntersuchung war mit einem erhöhten Zeit- und Kostenaufwand verbunden. Darüber hinaus erlaubte das erzeugte Fragment keine Genospeziesdifferenzierung. Diese wurde in einer dritten PCR zur Amplifikation eines Fragmentes des *hbb* Gens an zuvor positiv getesteten Proben

vorgenommen. Nach Durchführung der Untersuchungen zeigte sich, dass alle genannten Assays die Detektion sowohl von Vertretern der Lyme-Borrelien als auch der Rückfallfieber-Borrelien ermöglichen. Damit deckt das Primerpaar von Strube et al. (2010) mehr Borreliengenospezies ab als von den Autoren angegeben. Schlussendlich sollte sich zur Optimierung der Borrelienuntersuchung auf die Anwendung der real-time PCR und der im Anschluss durchgeführten PCR zum Nachweis der *hbb* Gensequenz beschränkt werden.

Der Nachweis verschiedenster Vertreter der Gattungen *Anaplasma*, *Ehrlichia* und *Cand. Neoehrlichia* sowie deren Speziesbestimmung wurde mit nur einem Primerpaar durch Detektion eines Fragmentes im 16S rRNA Gen ermöglicht. Im Vergleich zu vielen anderen in der Literatur publizierten Assays (Guillemi et al. 2015) verfügte die PCR damit über ein vergleichsweise großes Nachweisspektrum. Mit Ausnahme von *A. phagocytophilum* und *A. platys* war die Differenzierung aller in den Fokus genommenen Spezies möglich. Zur Unterscheidung der beiden Anaplasmen wäre demnach eine weitere PCR zum Nachweis eines weniger stark konservierten Genbereiches (z. B. *gltA*, *groEL*) erforderlich (Guillemi et al. 2015). Aufgrund der bisher offenbar fehlenden Verbreitung von *A. platys* in Deutschland ist die im Rahmen dieser Studie verwendete PCR jedoch als ausreichend zu betrachten. In Ergänzung zur Sequenzierung positiver Proben wurde die HRM durchgeführt. Dieses Verfahren ist gegenüber der konventionellen Methode zeiteffektiver. Allerdings wurde bislang nur die Differenzierung von drei Spezies (*A. phagocytophilum*, *Cand. Neoehrlichia mikurensis*, *E. canis*) anhand ihres Schmelzkurvenverlaufs geprüft (Krücken et al. 2013).

In der Literatur werden vor allem Bereiche des 16S rRNA-, *gltA*-, *ompA*- bzw. *ompB*-Gens zum Nachweis von Rickettsien angeführt (Guillemi et al. 2015). Aufgrund seiner vergleichsweise geringen Konservierung erlaubt das *gltA*-Gen die Differenzierung einer großen Vielfalt an Genospezies (Roux et al. 1997). Im Rahmen dieser Studie wurden zwei verschiedene auf dem *gltA*-Gen basierende Assays verwendet (Schreiber et al. 2014). Die zunächst angewandte PCR (203 bp) wurde aufgrund ihrer hohen Sensitivität (5 Kopien) zur Bestimmung der allgemeinen Rickettsien-Prävalenz herangezogen. Nachteiligerweise differenzierte die PCR nicht zwischen *R. sibirica* und der für *D. reticulatus* wesentlichen Genospezies *R. raoultii*. Mithilfe der zweiten, deutlich spezifischeren, aber dafür weniger sensitiven (50 Kopien) PCR (676 bp) konnte im Anschluss die genaue Genospezies bestimmt werden. Die Kombination beider Assays ermöglichte die Durchführung ausgesprochen sensitiver und spezifischer Erregeruntersuchungen, welche jedoch mit einem vergleichsweise hohen Arbeits- und Zeitaufwand verbunden waren. Aufgrund der hohen Prävalenz in *D. reticulatus* konnte damit nur eine Stichprobe zur Ermittlung der Rickettsien-Genospezies untersucht werden.

5.2 Geschlechterverhältnis von *Dermacentor reticulatus*

Die Differenzierung der adulten Buntzecken in ihre Geschlechter verdeutlichte ein konstant höheres Vorkommen weiblicher *D. reticulatus* an sämtlichen Standorten sowie in allen Saisons und Untersuchungsjahren. Wie auch Bartosik et al. (2011) beobachteten, waren lediglich zu Beginn der Herbstsaison regelmäßig mehr männliche Exemplare vertreten. Die allgemeine Dominanz weiblicher wirtssuchender Buntzecken wurde u. a. auch in den Untersuchungen von Immler (1973), Hornok und Farkas (2009), Siroký et al. (2011), Bartosik et al. (2012), Zając et al. (2016) und Olivieri et al. (2017) beschrieben. In Übereinstimmung mit Bartosik et al. (2011), Bartosik et al. (2012) und Buczek et al. (2013) war zudem der nochmals höhere Anteil der Weibchen im Frühjahr im Vergleich zum Herbst auffällig. Da Buntzecken teilweise auch auf Wirten den Winter überdauern, wird als Ursache das längere Verharren männlicher Zecken auf den Wirten nach dieser Periode angeführt (Bartosik et al. 2011). Zudem verdeutlichten Mierzejewska et al. (2015c), dass in den Wintermonaten die Mehrheit der anhaftenden Zecken auf den Wirtstieren von männlichen *D. reticulatus* gestellt wird. Umfassende zielgerichtete Studien zur Ursache des generellen Überschusses weiblicher *D. reticulatus* auf der Vegetation liegen bislang jedoch nicht vor. Grundsätzlich werden Ungleichgewichte im Geschlechterverhältnis häufig bei metastriaten Zecken beobachtet (Kiszewski et al. 2001). Ursachen sind möglicherweise in dem intensiven Wirtssuchverhalten weiblicher Zecken oder in dem Paarungsverhalten metastriaten Männchen, welche aufgrund mehrfacher Kopulationen (\varnothing 20 bis 30-mal) ausgesprochen lange auf dem Wirtstier verbleiben, zu suchen (Immler 1973, Oliver 1989, Bartosik et al. 2011, Buczek et al. 2013). Studien zur Untersuchung wirtsgebundener Zecken dokumentierten jedoch eine ebenfalls höhere Anzahl weiblicher *D. reticulatus* im Großteil des Jahres (Hamel et al. 2013, Reye et al. 2013, Beck et al. 2014, Eichenberger et al. 2015, Ionita et al. 2016, Król et al. 2016a), sodass ein grundsätzlich geringerer Anteil männlicher Zecken an der Gesamtpopulation zu vermuten ist. Auf Grundlage der Beobachtungen von Immler (1973) ist möglicherweise von einem Überschuss sich entwickelnder Weibchen aus den Gelegen auszugehen. Denkbar wäre auch eine generell geringere Lebenserwartung männlicher Buntzecken unter Feldbedingungen. Ein möglicher Grund könnte in dem hohen Energieverbrauch liegen, welcher bei männlichen Vertretern der Arthropoden aufgrund des hohen Motilitätsverhaltens während der Suche nach Weibchen und bei der Kopulation besteht (Marshall 1981). Ebenso sind unterschiedliche Reaktionen auf bestehende Wetterverhältnisse denkbar, wobei vergleichende Untersuchungen bislang kaum existieren. Lediglich experimentell durchgeführte Untersuchungen zum Wasserhaushalt beider Geschlechter zeigten eine längere Lebensdauer männlicher *D. reticulatus* bei verschiedenen, aber konstanten Luftfeuchtigkeitswerten. Schwankende Werte im Rahmen kombinierter De- und Rehydratationsversuche führten hingegen zu einer verhältnismäßig

längeren Überlebenszeit der Weibchen (Meyer-König et al. 2001a, b). Ein weiterer Ansatzpunkt könnte eine Unterschätzung der männlichen Population darstellen. Methodisch bedingt ist möglicherweise das Fangen einer repräsentativen Anzahl männlicher Zecken aus der Gesamtpopulation nicht möglich. Auch hier fehlen entsprechende Untersuchungen.

5.3 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Zeckenaktivität

5.3.1 Auswertung mittels Negativ-Binomial-Regressionsanalyse

Anhand der hier gewonnenen Sammeldaten sowie der bereits in der Literatur publizierten Erkenntnisse sind starke Aktivitätsschwankungen bei *D. reticulatus* erkennbar. Die Aktivität von Zecken wird durch eine Reihe biotischer und abiotischer Faktoren beeinflusst. Im Rahmen dieser Studie wurde der Einfluss der Parameter Fangort, Jahr, Saison, Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit untersucht. Bei der Beurteilung der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass sich diese auf niederschlagsfreie und nahezu frostfreie Fangzeitpunkte beziehen, da bei geschlossener Schneedecke, nasser Vegetation und Temperaturen unter ungefähr 0 °C nicht geflaggt wurde. Da die einzelnen Parameter alle zeitgleich auf die Zecke wirken, sollten diese auch im komplexen Zusammenhang betrachtet werden. Aus diesem Grund erschien die multivariate Analyse mittels Regressionsrechnung (Negativ-Binomial-Modell) sinnvoller als die univariate Betrachtung immer einzelner Faktoren (z. B. Korrelationsberechnung nach Spearman oder Pearson). Trotz Betrachtung zahlreicher Parameter ist die Beurteilung ihres Einflusses auf die Zeckenaktivität insbesondere in Feldversuchen schwierig, da nie alle auf die Zecken wirkenden Faktoren erfasst werden können. In der Regel können dadurch schwache Abhängigkeiten der Zeckenaktivität von den einzelnen Variablen im Vergleich zu den kontrollierten Bedingungen in experimentell angelegten Untersuchungen nicht detektiert werden. Die Berechnungen der Pseudo- R^2 -Maße nach McFadden und Nagelkerke verdeutlichen jedoch, dass die untersuchten erklärenden Variablen wesentlich zur Anpassung des Schlussmodells an die Beobachtungsdaten führten, zeigen aber auch, dass das Modell nicht die gesamte Varianz der abhängigen Variable „Zeckenaktivität“ erklärt.

5.3.2 Fangort

Entsprechend der Modellrechnung wurden signifikante Unterschiede in der Aktivitätshöhe von *D. reticulatus* zwischen den vier untersuchten Fangorten vorgefunden. Darüber hinaus wurden auch zwischen nahe gelegenen Flächen innerhalb des Areals K. Wusterh. wesentliche Unterschiede im Zeckenvorkommen beobachtet. Demnach war der erforderliche Wechsel auf die Ersatzflächen ab dem Jahr 2011 (Kapitel 3.2.1.2) durch einen drastischen

Diskussion

Abfall der gemessenen Herbstaktivität im Vergleich zum Vorjahr (durchschnittliche Fangzahl/h: minus 49 %) und auch zu den verbleibenden Fangorten gekennzeichnet. Dieser ungewöhnlich hohe Rückgang erklärt damit die in Abb. 7 unter Punkt „B: K. Wusterh.“ dargestellte Diskrepanz zwischen der tatsächlich ermittelten Anzahl gesammelter Zecken und der in der Regressionsanalyse modellierten Werte. Große Unterschiede zwischen geringen räumlichen Distanzen wurden ebenfalls in der Aktivität von *D. occidentalis* beobachtet (Lane et al. 1985).

Unterschiede in der Vegetationsstruktur und dem damit verbundenen Mikroklima, dem Wirtsangebot und der Nutzung durch den Menschen sind mögliche Gründe für diese Differenzen. Olivieri et al. (2017) sehen zudem im Habitat vorhandene Gewässer als wichtigen Einflussfaktor, wonach Standorte mit Seen bzw. stagnierenden Wasserquellen höhere Buntzeckenvorkommen zeigen. Beobachtungen dieser Studie können dies nicht bestätigen, da ausschließlich im Sickerbecken am Standort Falkenberg stehendes Wasser über weite Teile des Jahres vorhanden war und hier dennoch die niedrigste Buntzeckenaktivität gemessen wurde. Bezug nehmend auf den Nutzungsfaktor unterlagen ausschließlich die Standorte Güterfelde und K. Wusterh. einer gewissen anthropogenen Nutzung (Wiesen: einmal jährliches Mähen im Juni). Falkenberg und Gatow blieben Brachlandflächen und wurden das gesamte Jahr nicht bewirtschaftet (Falkenberg) bzw. es wurden ausschließlich kleinere Wege gemäht (Gatow). Da die höchsten (Gatow) als auch die niedrigsten (Falkenberg) Buntzeckenaktivitäten auf den brachliegenden Flächen beobachtet wurden, konnte kein Unterschied in der Zeckenaktivität zwischen den beiden untersuchten Habitatsstrukturen erfasst werden. Auch Biaduń (2011) berichtete von vergleichbaren Zahlen in diesen beiden Habitatstypen. Im Gegensatz dazu dokumentierten Bajer et al. (2017) einen 6-fachen Rückgang der *D. reticulatus*-Aktivität an Standorten, die dreimal pro Jahr über einen Zeitraum von drei Jahren gemäht wurden. Basierend auf ihren Beobachtungen betonen die Autoren jedoch, dass ausschließlich regelmäßiges Mähen diesen Effekt hervorruft. Auch Mierzejewska et al. (2015a) beschrieben beim Vergleich beider Strukturtypen ein ca. 3,5-mal häufigeres Vorkommen auf brachliegenden Flächen. Beide Habitatsstrukturen zeigten jedoch bedeutend höhere Buntzeckenaktivitäten im Vergleich zu intensiver genutzten Gebieten (z. B. Weiden) (Hornok und Farkas 2009, Mierzejewska et al. 2015a). Anhand der im Jahr 2011 aufgeforsteten Teilfläche in K. Wusterh. (Kapitel 3.2.1.2) wurde dieser Aspekt auch in der jetzigen Untersuchung deutlich. Auf dem zuvor zeckenreichen Teilgebiet wurden seit dem Anpflanzen junger Baumbestände und der regelmäßigen Pflege dieser Flächen keine Buntzecken mehr bei Probesammlungen gefunden. Grundsätzlich scheinen die mit der Nutzungsart eines jeweiligen Gebietes verbundene Vegetationsstruktur und das vorhandene Wirtsangebot von entscheidendem Einfluss zu sein (Hornok et al. 2014, Mierzejewska et al. 2015a).

Die Bedeutung der Vegetation wird möglicherweise durch ihre Zusammensetzung und Dichte und den damit einhergehenden Einfluss auf das Mikroklima hervorgerufen. Entsprechend Karbowiak (2014) fördert eine dichte Vegetation ein stabiles Mikroklima und mindert damit die Gefahr von extremen klimatischen Bedingungen. Aufgrund ihrer Rolle als Nahrungsquelle bzw. als Lebensraum ist die Vegetation zudem von grundlegender Bedeutung für das Wirtsaufkommen (Estrada-Peña et al. 2013b, Zajac et al. 2016). Im Rahmen dieser Studie wurde keine detaillierte Untersuchung der Vegetationsstruktur vorgenommen. Alle Standorte wurden nur von wenigen Baumgruppen durchzogen. Dennoch fiel der zeckenreichste Standort Gatow (Heide) durch eine vergleichsweise dichte und artenreiche Flora auf. Neben den an den verbleibenden Standorten (Rieselfelder) dominierenden Süßgräsern waren in Gatow auch große Bestände von Rainfarn, Kanadischer Goldrute und Brombeere zu finden.

Zeiträume einer erhöhten Wirtsaktivität waren mit einer gesteigerten Aktivität von *D. reticulatus* verbunden (Bartosik et al. 2012). Im Rahmen dieser Studie wurden ebenfalls keine gezielten Beobachtungen des Wirtsaufkommens durchgeführt. Auffällig erscheint jedoch die walddnahe Lage der zeckenreichsten Standorte Gatow und Güterfelde. Damit könnte ein erhöhtes Vorkommen der Hauptwirte verbunden sein, welche in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium Kleinsäuger, Cerviden, Schwarzwild und Füchse umfassen (Földvári et al. 2016). Insbesondere in Gatow konnte eine stabile Wirtspopulation durch das Sichten von Wildschweinrotten sowie ihrer zahlreichen Wühlspuren bestätigt werden. Darüber hinaus wurde dieses Gebiet stark von Spaziergängern mit ihren Hunden frequentiert, wobei Letztere ebenfalls als Hauptwirt gelten (Földvári et al. 2016). Mündliche Überlieferungen einer ansässigen Tierärztin bestätigten die häufige Infestation der dieses Areal durchstreifenden Hunde mit *D. reticulatus*. Hinzu kommt, dass brachliegende Flächen häufig ein hohes Vorkommen an Kleinsäufern, welche wiederum die Wirte juveniler Stadien darstellen, aufweisen (Mierzejewska et al. 2015a). Das Fehlen von Kleinsäufern aufgrund von durchgeführten Brandrodungen diskutieren die Autoren als eine der wichtigsten Komponenten für eine geringe Zeckenaktivität. Durch die dichte Vegetation am Standort Gatow scheinen optimale Voraussetzungen als Lebens- und Schutzraum für juvenile Wirte vorzuliegen.

5.3.3 Wetterbedingte Einflüsse

Temperatur

Aufgrund der in den Felduntersuchungen beobachteten Temperatur- und Zeckenaktivitätsverläufen erschien die Annahme eines nicht-stetigen Einflusses der Temperatur, welcher durch die Variablen Temperatur und Temperatur² wiedergegeben

wurde, sinnvoll. Diese im Negativ-Binomial-Modell differenzierte Betrachtung der Temperatur zeigte einen jeweils deutlich signifikanten Einfluss und demonstrierte den unterschiedlichen Effekt der Temperaturhöhe auf die Aktivität von *D. reticulatus*. Bisherige Veröffentlichungen werteten den Einfluss dieses Parameters ohne Betrachtung verschiedener Effekte durch unterschiedliche Temperaturbereiche und fast ausschließlich mithilfe univariater statistischer Tests (Spearman-Korrelationsanalyse) aus. Im Ergebnis zeigte sich eine negative Korrelation der Buntzeckenaktivität bei steigenden Temperaturen (Martinod und Gilot 1991, Hubálek et al. 2003a, Bartosik et al. 2011, 2012, Zając et al. 2016). Dieser Zusammenhang stellt eine grobe Vereinfachung dar, da bekanntermaßen auch bei sehr niedrigen Temperaturen (z. B. Frost) keine Aktivität der Zecken messbar ist. Olivieri et al. (2017) konnten unter Verwendung eines generalisierten linearen gemischten Modells keinen Effekt der Temperatur feststellen, wobei auch hier keine Differenzierung verschiedener Temperaturbereiche vorgenommen wurde. Den hier vorgelegten Untersuchungen zufolge sollte die Temperatur zudem nicht losgelöst von der Saison (Kapitel 5.3.5) betrachtet werden. In Übereinstimmung mit Bartosik et al. (2011) wurden in Abhängigkeit von der vorliegenden Jahreszeit unterschiedliche Zeckenaktivitäten trotz ähnlicher Temperaturbereiche (Kapitel 4.1.4.1.4, Abschnitt Temperatur) beobachtet.

Entsprechend diesen Untersuchungen wurden 80 % der Buntzecken in einer Temperaturspanne von 5-23 °C gesammelt. Bartosik et al. (2011) definierten den Bereich hoher Aktivitäten ebenfalls zwischen 4-21 °C und auch andere Autoren hoben die Aktivität von *D. reticulatus* über weite Temperaturbereiche hervor (Zahler und Gothe 1995b, Zając et al. 2016, Olivieri et al. 2017). Unter- und oberhalb dieser Temperaturspanne schienen die Witterungsverhältnisse nicht dem Optimum dieser wechselwarmen Organismen zu entsprechen. Unterhalb von 5 °C wurden in dieser Studie Probenahmen bis zu einer minimalen Temperatur von -1,1 °C durchgeführt. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Kiewra et al. (2016) wurden starke Schwankungen der Zeckenaktivität (0 bis 182 *D. reticulatus*/h) in diesem Niedrig-Temperaturbereich beobachtet, wobei geringe bis keine Aktivitäten an vergleichsweise kalten Tagen dokumentiert wurden. Die niedrigste in dieser Studie gemessene Temperatur, bei der mindestens fünf *D. reticulatus* gefunden wurden, lag bei -0,5 °C und ähnelte damit der von Hubálek et al. (2003a) bestimmten minimalen Aktivitätstemperatur von -0,1 °C (Boden). Unterhalb dieser Temperaturen steigt möglicherweise die Gefahr des Erfrierens dieser psychrophilen (Hubálek et al. 2003a), aber Frost-intoleranten (Dautel und Knülle 1996) Zecke. In den untersuchten Habitaten wird üblicherweise die Temperatur des für *D. reticulatus* spezifischen Supercooling-Points (ca. -18 bis -20 °C), welcher der Temperatur entspricht, unterhalb derer es zur Kristallbildung in der Körperhöhle kommt (Burks et al. 1996a, Dautel und Knülle 1996), nicht erreicht. Daher ist möglicherweise das Prinzip des inokulativen Freezings von größerer Bedeutung. Dieses

führt durch Kontakt mit Eiskristallen in der Umwelt zum Erfrieren und tritt auch bei geringen Minustemperaturen und insbesondere in feuchten Gebieten auf (Burks et al. 1996b, Rosendale et al. 2016). Neben einer möglichen Bildung von Frostschutzstoffen, wie Glycerol und Zuckeralkoholen (Dautel 2010), reagieren Zecken auf die kalten Temperaturen durch Rückzug in schützende Bodenschichten (Burks et al. 1996a, Dörr und Gothe 2001) mit der Folge einer verringerten Aktivitätsmessung.

Wie eingangs bereits beschrieben, wurde eine geringere Anzahl gefangener *D. reticulatus* auch in einem Temperaturbereich ab 23 °C dokumentiert. Hohe Temperaturen bewirken nicht nur eine verminderte Aktivität, sondern reduzierten in experimentellen Untersuchungen auch die Überlebensfähigkeit von *D. reticulatus* (Zahler und Gothe 1995b). Als grundlegende Ursache ist die Funktionsstörung wichtiger Eiweiße oberhalb eines Temperaturoptimums zu nennen (Campbell und Reece 2003). Darüber hinaus spielt möglicherweise die Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes der Zecke eine wesentliche Rolle. In Abhängigkeit von der Höhe der relativen Luftfeuchtigkeit kann dieser durch hohe Temperaturen und dem damit verbundenen steigenden Sättigungsdefizit negativ beeinflusst werden (Estrada-Peña et al. 2013b). Zum Schutz vor Austrocknung scheint ein Rückzug der Buntzecken in mildere Klimabereiche der Bodenschichten vorstellbar.

Relative Luftfeuchtigkeit

Die Bedeutung der relativen Luftfeuchtigkeit für das Überleben von *D. reticulatus* wird anhand experimenteller Versuche deutlich, wonach die Lebenserwartung der Buntzecken mit sinkenden relativen Luftfeuchtigkeitswerten abnimmt (Zahler und Gothe 1995b, Meyer-König et al. 2001a). Die relative Luftfeuchtigkeit stellt den entscheidenden Parameter für die Wasseraufnahme einer Zecke dar und ist damit von wesentlicher Bedeutung in der Regulation des Wasserhaushaltes. Sie erfolgt nur oberhalb des „Critical Equilibrium Activity-Wertes“ (CEA), welcher für *D. reticulatus* bei ungefähr 84 % relativer Luftfeuchtigkeit liegt (Knülle und Rudolph 1982, Meyer-König et al. 2001a). Über Tagesluftfeuchtigkeitswerte oberhalb des CEA oder durch Rückzug in bessere Klimate der Bodenschicht erfolgt die Rehydratation der Buntzecken (Immler 1973, Knülle und Rudolph 1982, Meyer-König et al. 2001b). Die mikroklimatischen Bedingungen in Bodennähe weisen aufgrund der geringfügigeren Sonneneinstrahlung und Windeinwirkung u. a. höhere und konstantere Luftfeuchtigkeitswerte auf. Damit unterscheiden sie sich von den in dieser Studie gemessenen Luftfeuchtigkeitswerten, welche sich durch größere Variabilitäten auszeichnen, dafür durch die Messung in höheren Vegetationsschichten jedoch eher dem Aktionsbereich der wirtssuchenden adulten Zecken entsprechen.

Die im Rahmen dieser Studie gemessenen Werte der relativen Luftfeuchtigkeit zeigten unabhängig von der Saison hochgradige Schwankungen (24-90 %) und ließen kein Muster

im Hinblick auf die ermittelte Anzahl gesammelter Zecken erkennen. Die statistische Auswertung mittels Negativ-Binomial-Regressionsanalyse bestätigte einen fehlenden oder zu schwachen Einfluss dieses Parameters auf die Aktivität von *D. reticulatus*. Auch andere Studien, welche überwiegend univariate statistische Tests verwendeten, konnten keine Korrelation zwischen der während eines Tages oder längerer Zeiträume gemessenen relativen Luftfeuchtigkeit und der Zeckenaktivität feststellen (Bartosik et al. 2011, 2012, Buczek et al. 2013, Zajac et al. 2016, Olivieri et al. 2017). Lediglich Hubálek et al. (2003a) beobachteten einen schwach positiven, jedoch signifikanten Einfluss.

Die Gründe einer fehlenden Signifikanz dieses doch bedeutenden Faktors sind möglicherweise in einer deutlichen Toleranz von *D. reticulatus* gegenüber suboptimalen Luftfeuchtigkeitsverhältnissen zu suchen. Meyer-König et al. (2001a) heben das Integument von *D. reticulatus* als wichtigen Faktor der Widerstandsfähigkeit hervor, welches bei 20 °C und 76 % relativer Luftfeuchtigkeit mit einer Rate von <0,1 %/h eine vergleichsweise geringe Transpiration zulässt. Darüber hinaus könnte womöglich das Bewegungsmuster der Buntzecken eine bedeutende Rolle spielen. *Dermacentor reticulatus* verharrt während der Wirtssuche nach einer anfänglichen dreitägigen Findungsphase nahezu bewegungslos an der Warteposition und führt damit im Vergleich zu *I. ricinus* weitaus weniger vertikale Bewegungen durch (Immler 1973). Dies verringert wiederum die Frequenz der sich bei Bewegung öffnenden Stigmen und den damit einhergehenden Wasserverlust durch Respiration (Knülle und Rudolph 1982). Daneben verfügt *D. reticulatus* über eine große austauschbare Wassermasse (Meyer-König et al. 2001b). In experimentell durchgeführten Dehydratationsversuchen an *D. reticulatus* bestimmten die Autoren die kritische Wassermenge der Zecken. Diese bezeichnet den durch Dehydratation bedingten verbleibenden prozentualen Anteil an Wasser einer zuvor vollständig hydrierten Zecke, welcher bei Erreichen der vollkommenen Immobilität vorliegt. In Abhängigkeit von Geschlecht und Ausgangsgewicht wurde dieser Grenzwert unter den bestehenden Bedingungen (0 % RH, 20 °C) erst nach ca. 16-27 Tagen und ab einem Wasserverlust von mindestens 40 % erreicht. Erste Lokomotionsstörungen traten zudem erst 1-2 Tage vor Erreichen der Kritischen Wassermenge auf. Die aufgeführten Aspekte erklären damit möglicherweise die unter experimentellen Bedingungen bestimmte Überlebensfähigkeit von *D. reticulatus* für eine gewisse Zeit auch unterhalb des CEA (z. B. 33 % RH und 20 °C: 43 Tage) (Zahler und Gothe 1995b, Meyer-König et al. 2001a). In der hier durchgeführten Untersuchung sowie in vielen weiteren Studien wurde ebenfalls eine hohe Anzahl wirtssuchender Zecken unterhalb des CEA beobachtet (Bartosik et al. 2011, Zajac et al. 2016). In der vorliegenden Untersuchung erreichte die relative Luftfeuchtigkeit sogar an 96,6 % der Untersuchungstage nicht diesen Wert. Es ist jedoch davon auszugehen, dass zwischenzeitliche Anstiege der relativen Luftfeuchtigkeit über Nacht oder zwischen den zweiwöchigen Messintervallen verpasst wurden und dementsprechend nicht in die Berechnung

zum Einfluss dieses Parameters eingeflossen sind. Darüber hinaus wurde keine Beprobung an regnerischen Tagen, welche mit einer hohen Luftfeuchtigkeit einhergehen, vorgenommen, da die Befürchtung bestand, dass durch die veränderte Mikrofaserstruktur der nassen Flagge mögliche aktive Zecken schlechter anhaften können und damit die Sammeldaten verfälscht würden. Auf der anderen Seite fehlen grundsätzlich Untersuchungen über die Aktivität von *D. reticulatus* bei nasser Vegetation. Unter diesen Gesichtspunkten kann die Beurteilung des Faktors der relativen Luftfeuchtigkeit nur unter Vorbehalt erfolgen.

5.3.4 Jahr

Zur Beurteilung zeitlicher Einflüsse besteht in Langzeitstudien die Möglichkeit den Faktor Jahr in die Aktivitätsuntersuchungen mit einzubeziehen. In den hier vorgelegten Berechnungen wurde die Variable Jahr als Kofaktor aufgenommen, hatte selbst aber keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität von *D. reticulatus*. In der Literatur wird der Einfluss dieses Faktors auf die Zeckenaktivität nur in wenigen Veröffentlichungen diskutiert, weil dazu sehr kostenintensive Langzeitstudien benötigt werden, die nur selten finanziert werden. Während Zajac et al. (2016) in Übereinstimmung mit diesen Untersuchungen keine wesentlichen Unterschiede in den ermittelten Zeckenzahlen zwischen den Jahren feststellen konnten, verzeichneten Mierzejewska et al. (2015a) hingegen einen signifikanten Anstieg der Buntzeckenaktivitäten von Herbst 2011 bis Sommer 2014. Die Autoren selbst schränken diese Aussage ein, da nur die Jahre 2012 und 2013 vollständig beprobt wurden. Interessant wäre die Betrachtung eines Zeitraumes über mehr als zwei Jahre, um Einflüsse wie z. B. eine mögliche Reduzierung der Zeckenpopulation durch das konstante Entfernen der Zecken aus dem Habitat und den damit einhergehenden Aktivitätsveränderungen zu untersuchen. In der vorliegenden Studie wurde immerhin eine Abnahme der Zeckenaktivität von der Herbstsaison 2010 zu 2011 an allen Standorten beobachtet, wobei in K. Wusterh. dieser Effekt am ausgeprägtesten war (Kapitel 4.1.4.1.2). In K. Wusterh. ist die Ursache jedoch in erster Linie in dem notwendigen Wechsel der Untersuchungsflächen zu sehen (Kapitel 3.2.1.2). Eine Erklärung für die übrigen Standorte kann aufgrund des Vergleiches von nur zwei Zeiträumen nicht gegeben werden. Das stetige Entfernen von Zecken stellt eine mögliche Ursache dar, wobei dieser Einfluss durch die Beprobung ausschließlich schmaler Wege so gering wie möglich gehalten wurde. Unterschiede in der Witterung, der Reproduktionsrate der Zecken, der Beschaffenheit der Flora und in dem Wirtsaufkommen sind ebenfalls von Bedeutung. Langfristige klimatische und ökologische Effekte sind ebenfalls zu bedenken, allerdings ist die Abgrenzung zu relativ kurzfristigen Effekten des Wetters nur durch lang angelegte Studien möglich.

5.3.5 Saison

Der im Regressionsmodell durchgeführte Vergleich der Buntzeckenaktivität in Abhängigkeit von der Saison zeigte signifikante Unterschiede und verdeutlichte die Notwendigkeit, die Aktivität von *D. reticulatus* auch unter dem jahreszeitlichen Gesichtspunkt zu betrachten. In Übereinstimmung mit anderen europäischen Studien wurden die meisten Buntzecken im Frühjahr und Herbst geflaggt, wohingegen nahezu keine bzw. variierende Aktivitäten im Sommer bzw. Winter gemessen wurden (Nosek 1972, Immler 1973, Hornok 2009, Bartosik et al. 2011). Untersuchungen von Olivieri et al. (2017) in Norditalien zeigten hingegen Aktivitäten adulter *D. reticulatus* ausschließlich zwischen Februar und Juni. In der jetzigen Studie reichte der Zeitraum der Frühjahrsaison von Anfang März bis Ende Mai und der der Herbstsaison von Mitte August bis Ende November. In Übereinstimmung mit Bartosik et al. (2011) treten im Vergleich zu Studien anderer geografischer Gebiete teilweise Unterschiede im Beginn bzw. der Dauer der einzelnen Saisons auf (Martinod und Gilot 1991, Hornok 2009, Hornok und Farkas 2009). Aufgrund der in solchen Studien begrenzten Zahl von Untersuchungsjahren ist aber nicht klar, ob die beschriebenen Differenzen z. T. nicht einfach auf Unterschieden zwischen den Jahren beruhen.

Jede Saison selbst repräsentiert einen großen Zeitraum, innerhalb dessen offenbar ähnliche abiotische und biotische Faktoren herrschen und somit den relativ gleichartigen Aktivitätsverlauf von *D. reticulatus* während eines jeweiligen Jahresabschnitts hervorrufen. Die Saisonalität der Buntzecken wird durch eine charakteristische Vegetation, durch das Wirtsaufkommen sowie durch das vorliegende Mikro- und Makroklima, wobei insbesondere die Temperatur und die Photoperiode zu berücksichtigen sind, hervorgerufen (Hornok und Farkas 2009, Buczek et al. 2014). Hinzu kommt jedoch auch der natürliche Entwicklungszyklus dieser Zeckenspezies, wonach Larven, Nymphen und Adulte unterschiedliche Aktivitätszeiten im Verlauf eines Jahres zeigen. Das saisonale Verhalten setzt sich dabei aus Reaktionen auf Umwelteinflüsse und aus vorprogrammierten Mustern zusammen (Sonenshine und Roe 2014). Da im Rahmen dieser Untersuchungen keine saisongebundenen Aufzeichnungen zur Vegetationsstruktur und zum Wirtsaufkommen gemacht wurden, können diesbezüglich keine Aussagen getroffen werden. Grundsätzlich ist jedoch von Veränderungen in der Dichte und Zusammensetzung der Vegetation und einem damit variierenden Mikroklima innerhalb eines Jahres auszugehen. Damit verändert sich auch die von der Vegetation abhängige biologische Jahresrhythmik vieler Wirte oder auch Prädatoren von *D. reticulatus*.

Unter Betrachtung der klimatischen Faktoren zeigten die Frühjahrs- und Herbstsaison an allen Fangorten und in allen Fangjahren die höchsten Buntzeckenaktivitäten und scheinen demnach die besten Bedingungen innerhalb eines Jahres zu bieten. Die Durchschnittswerte der ermittelten Temperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit betragen 14,5 °C und 47,1 %

Diskussion

(Frühjahr) bzw. 14,3 °C und 62,5 % (Herbst). Der Vergleich dieser beiden Saisons untereinander zeigte um bis zu 5,21-mal (2010) bzw. 1,31-mal (2011) niedrigere Aktivitäten im Frühjahr. Die hohen Differenzen im Jahr 2010 sind vermutlich auf eine unvollständige Erfassung der Zeckenaktivitäten in diesem Frühjahr durch den erst Ende März stattfindenden Studienstart zurückzuführen. Untermauert wird diese These durch den Vergleich der Frühjahrsaktivitäten beider Sammeljahre, wonach im Jahr 2010 der charakteristische, einer Optimumskurve ähnelnde Verlauf nicht ausgebildet ist und sich somit zeigt, dass der Frühjahrspeak in diesem Jahr verpasst wurde. Auf Basis des Regressionsmodells wurde im Vergleich zum Herbst im Frühjahr dennoch eine um den Faktor 2,58 signifikant geringere Anzahl aktiver wirtssuchender *D. reticulatus* ermittelt. Diese Aktivitätsunterschiede stimmen mit Studien in Polen und Ungarn überein (Széll et al. 2006, Hornok 2009, Bartosik et al. 2011, 2012, Buczek et al. 2013). Wiederum andere Studien in Polen, Belgien und Frankreich berichteten hingegen von höheren Aktivitäten im Frühjahr (Martinod und Gilot 1991, Cochez et al. 2012, Mierzejewska et al. 2015a). Ursachen dieser Differenzen sind bislang nicht bekannt.

Im Gegensatz dazu war der Sommer, mit Ausnahme weniger wirtssuchender Zecken zu Beginn der Phase, durch einen vollständigen und gegenüber den übrigen Saisons signifikanten Rückgang der Aktivität adulter *D. reticulatus* geprägt. Buntzecken konnten trotz teilweiser, dem zeckenreichen Frühjahr bzw. Herbst, ähnlich temperierter Fangtage (z. B. Sommer Güterfelde 2011: 15-17 °C) nicht gesammelt werden. Als Vertreter der „short day species“ tritt *D. reticulatus* mit zunehmenden Tageslängen und dem Erreichen des zeckenspezifischen Grenzwertes („critical photoperiod“) womöglich in die Diapause ein (Belozarov 1982, Tokhov et al. 2014). Bartosik et al. (2011), Martinod und Gilot (1991), Zając et al. (2016) und Bogdaszewska (2004) verdeutlichten die negative Korrelation der Buntzeckenaktivität mit der Tageslichtlänge. Dieses Ruhestadium der wirtssuchenden Zecken stellt eine vorprogrammierte präadaptive Reaktion dar, um bevorstehende suboptimale Umweltbedingungen mit möglichst geringem Energieverlust zu überdauern (Belozarov 1982). Der hier vorgelegten Untersuchung zufolge bewirken hohe Temperaturen, welche in den beprobten Gebieten insbesondere in den Sommermonaten bestehen, eine Verminderung der Buntzeckenaktivität und können damit als mögliche Ursache betrachtet werden. Der Schwellenwert zum Eintritt in die Diapause ist ebenfalls temperaturabhängig. Hohe Temperaturen bewirken ein vorzeitiges Erreichen der „critical photoperiod“ und bekräftigen die Bedeutung dieses Parameters im Zusammenhang mit dem präadaptiven Verhalten (Belozarov 1982).

Im Winter wurden im Rahmen dieser Studie zahlreiche *D. reticulatus* gesammelt, wobei die Aktivität großen Schwankungen unterlag (0 bis 182 *D. reticulatus*/h) und damit einer Vielzahl anderer Studien entsprach (Széll et al. 2006, Hornok 2009, Buczek et al. 2014, Kiewra et al.

Diskussion

2016). Entsprechend der Modellrechnung waren unter Betrachtung ähnlicher Temperaturwerte im Winter sogar signifikant mehr Zecken aktiv als im Frühjahr. Grundsätzlich ist jedoch zu bedenken, dass im Winter nur an Tagen mit geeigneter Witterung (keine geschlossene Schneedecke, Tagestemperatur ca. über 0 °C) geflaggt wurde. In Übereinstimmung mit Zahler und Gothe (1995b) deuten die aktuellen Ergebnisse zur Winteraktivität in hiesigen Breitengraden auf ein Quieszenzverhalten hin und nicht wie so oft diskutiert auf eine Diapause (Hornok 2009, Buczek et al. 2013, Földvári et al. 2016, Kiewra et al. 2016). Die Quieszenz beschreibt ebenfalls eine Verminderung der Stoffwechselaktivität, allerdings als Folge suboptimaler Umweltbedingungen und nicht aufgrund präadaptiver Verhaltensmuster. Womöglich stellt die Temperatur einen wichtigen Faktor in diesem Zusammenhang dar. Diesen und den von Buczek et al. (2014) und Hornok (2009) durchgeführten Untersuchungen zufolge schienen kurzfristige Aktivitätsänderungen von *D. reticulatus* im Zusammenhang mit Temperaturänderungen aufzutreten. Demnach wurde in der aktuellen Studie ein starker Rückgang in der Anzahl gesammelter Buntzecken (0-3 Zecken/h) mit dem Absinken der Temperatur auf den Nullpunkt Mitte Februar beobachtet, obwohl in den 1-2 Wochen zuvor weitaus höhere Aktivitäten (79-101 *D. reticulatus*/h) bei Temperaturen von ungefähr 8 °C dokumentiert wurden. Mit Anstieg der Temperatur auf durchschnittlich 6,4 °C in den ersten Märztagen 2011 wurden wiederum 16-60 *D. reticulatus*/h gesammelt. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass adulte Buntzecken ihre Aktivität in den Wintermonaten verhältnismäßig kurzfristig an die gegebenen Temperaturen anpassen und somit suboptimale Temperaturbereiche zum Eintritt in die Quieszenz führen. Aufgrund der vergleichsweise selten und unregelmäßig durchgeführten Probennahmen während der Wintermonate können die Faktoren, die zu den hier dokumentierten Aktivitätsschwankungen führen, jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. Möglicherweise ist das Vorhandensein einer geschlossenen Schneedecke ebenfalls von großer Bedeutung. Dieser Aspekt kann aufgrund der unter diesen Bedingungen eingestellten Probennahme jedoch nicht beurteilt werden. Allerdings wurden in dieser Studie hohe Buntzeckenaktivitäten mit der einsetzenden Schneeschmelze Mitte Januar 2011 beobachtet. Chitimia-Dobler (2015) beschrieb hingegen Funde von gesogenen weiblichen *D. reticulatus* an Wirtstieren trotz andauernd geschlossener Schneedecke (1 m).

5.4 Prävalenzvergleich und Relevanz der untersuchten Erreger

5.4.1 *Babesia* spp.

Prävalenzen von *Babesia* spp.

Die im Rahmen dieser Studie bestimmte Prävalenz verschiedener *Babesia* spp. von 0 % deckt sich mit der Mehrzahl der bislang in Deutschland durchgeführten Untersuchungen an wirtssuchenden (Silaghi et al. 2012a, Weis 2014) als auch an angesogenen *D. reticulatus* (Dautel et al. 2006, Najm et al. 2014, Schreiber et al. 2014, Obiegala et al. 2015). Lediglich Beelitz et al. (2012) (Saarland) und Naucke (2008) (deutschlandweit) beschrieben Prävalenzen von 2,5 % (n=397) bzw. 0,48 % (n=2500), wobei es sich bei der letztgenannten Publikation vermutlich um bereits gesogene Zecken, ohne Angaben zu einem möglichen Reisehintergrund ihrer Wirte (Hunde), handelte. Zum Vergleich zeigen Untersuchungen zu Babesien-Prävalenzen in wirtssuchenden Buntzecken in anderen Ländern Europas und Asiens Spannen von 0-21,6 % (Tab. 1, Kapitel 2.2.1.3). Das Ergebnis der aktuellen Studie deckt sich mit der Mehrheit anderer Untersuchungen in Nordwest- und Mitteleuropa, wonach keine Babesien in wirtssuchenden Buntzecken in den Niederlanden und Belgien (n=230) (Cochez et al. 2012), Österreich (n=153) (Duscher et al. 2016), Westpolen (n=592 bzw. 337) (Mierzejewska et al. 2015b, Król et al. 2016a) und der Westslowakei (n=874) (Kubelová et al. 2011) bzw. nur verhältnismäßig geringe Prävalenzen von 1,87 % (n=230; Niederlande/Belgien) (Jongejan et al. 2015) beschrieben wurden. Die hohe Prävalenz von 13,4 % in einer Untersuchung in Großbritannien ist lediglich auf die hohe Infektionsrate von Zecken, die aus einem einzigen aus den insgesamt sechs beprobten Gebieten stammen, zurückzuführen. Demnach wurden dort 14 der 15 positiven Zecken gefunden (de Marco et al. 2017). Aus Ländern wie Frankreich, Spanien und Italien, welche regelmäßig von durch *B. canis* verursachten Krankheitsfällen berichten (Cassini et al. 2009, Halos et al. 2014), liegen kaum Untersuchungen zur Infektionslage von wirtssuchenden *D. reticulatus* mit Babesien vor (García-Sanmartín et al. 2008, Bonnet et al. 2013, Olivieri et al. 2016). Vergleichsweise hohe Infektionsraten wurden hingegen häufig in östlich bzw. südöstlich gelegenen Ländern Europas gefunden: Serbien 21,6 % (n=51) (Mihaljica et al. 2012), Lettland 2,8 % (n=181) (Radzijeuskaja et al. 2017), Ostpolen 5,42 % (n=1993) (Mierzejewska et al. 2015b) bzw. 4,5 % (n=468) (Wójcik-Fatla et al. 2012), Südost-Slowakei 14,7 % (n=327) (Kubelová et al. 2011), Ungarn 8,2 % (n=413) (Hornok et al. 2016) und Ukraine 3,41 % (n=205) (Karbowski et al. 2014). Auch die Untersuchungen von wirtsgebundenen Buntzecken in westlichen Regionen Europas widerspiegeln die Ergebnisse der aktuellen Studie. Demnach konnten in den Niederlanden, der Schweiz, Belgien und Polen in von Hunden, Katzen, Pferden und Wiederkäuern abgenommenen adulten Zecken (n=19-1092) keine Babesien nachgewiesen werden (Nijhof et al. 2007, Claerebout et al. 2013,

Eichenberger et al. 2015, Jongejan et al. 2015, Król et al. 2016b). Prävalenzen von 6,1 % (n=33) bis 29,9 % (n=181) stammen lediglich aus Studien in Polen, Ungarn, der Ukraine und Rumänien, welche jedoch auch auf mögliche klinische Symptome in einem Teil der beprobten Hunde hinweisen. Allerdings erfolgte keine Untersuchung der entsprechenden Wirte. Auch geht aus den Beschreibungen nicht hervor, inwieweit die untersuchten Buntzecken von genau diesen Tieren abgenommen wurden (Földvári et al. 2007, Zygner et al. 2008, Hamel et al. 2013, Ionita et al. 2016). In Anbetracht des unterschiedlichen Prävalenzmusters zwischen west- und (süd)östlichen Gebieten Europas, gliedert sich die aktuelle Studie mit ihrem Ergebnis hervorragend in die Prävalenzsituation westlicher Regionen ein. Mierzejewska et al. (2015b) führen die unterschiedlichen Infektionsraten auf das Vorliegen zweier großer *D. reticulatus*-Populationen (Ost- und Westzone) zurück, welche unterschiedlicher Herkunft sind und durch eine buntzeckenfreie Zone in Zentralpolen getrennt sind. Analysen von molekularen Markern zur Herkunft von aus beiden Zonen gesammelten Buntzecken lassen diese klare Trennung der Populationen jedoch nicht erkennen und bestreiten die Bedeutung der erwähnten buntzeckenfreien Zone (Kloch et al. 2017). Andere Autoren deklarieren vielmehr eine allmähliche Ausbreitung von Babesien-Infektionen in *D. reticulatus* in Europa von südöstlicher in nordwestlicher Richtung (Kubelová et al. 2011).

Relevanz für die Tier- und Humangesundheit

Trotz der im Zuge dieser Untersuchung bestimmten fehlenden Prävalenz von Babesien ist die klinische Relevanz, insbesondere mit Blick auf *B. canis*, in Deutschland nicht zu unterschätzen. Wie auch in anderen bislang nicht endemischen Ländern (Matjila et al. 2005, Øines et al. 2010, Berzina et al. 2013, Schaarschmidt et al. 2013, Halos et al. 2014, Sánchez-Vizcaíno et al. 2016, de Marco et al. 2017) treten hierzulande vermehrt autochthone Erkrankungsfälle auf, welche vorwiegend dem süddeutschen Raum und v. a. der Nähe zur endemischen französischen Grenze entstammen (Gothe und Wegerdt 1991, Zahler et al. 2000, Barutzki et al. 2007, Halos et al. 2014). Auch im Raum Berlin/Brandenburg wurden wiederholt klinische Fälle beschrieben, wobei ein Reisehintergrund der Wirte zum Teil nicht ausgeschlossen werden konnte (Heile et al. 2006, Barutzki et al. 2007, Krücken et al. 2016, Liesner et al. 2016). Die dennoch fehlende Detektion von Babesien in den hiesigen Buntzecken ist möglicherweise auf einen bislang geringgradigen Durchseuchungsgrad der Zeckenpopulation zurückzuführen. Hinzu kommt der erschwerte Nachweis möglicher Infektionen durch das häufig beobachtete clusterhafte Auftreten *B. canis*-infizierter Zecken (Schaarschmidt et al. 2013, Mierzejewska et al. 2015b, de Marco et al. 2017). Aufgrund der zunehmenden Anzahl autochthoner Fälle ist die Erkrankung nicht mehr ausschließlich als Reise- und Importkrankheit zu betrachten. In

Anbetracht der hohen Erreger- und Seroprävalenzen (4,9-58 %) der Reisehunde (Barutzki et al. 2007, Menn et al. 2010, Hamel et al. 2011, Naucke 2011, Pantchev 2012) ist die Gefahr einer weiteren Ausbreitung von *B. canis* in Deutschland zu befürchten, wobei insbesondere subklinisch infizierte Hunde, welche möglicherweise als Reservoir fungieren, als Risikofaktor anzusehen sind (Vial und Gorenflot 2006, Földvári et al. 2016). Naive Buntzecken infizieren sich am Wirt und können über die transovarielle Weitergabe, welche über 3-4 Tochtergenerationen währt (Deplazes et al. 2013a), eine stabile Babesien-Infektion in der Zeckenpopulation aufbauen (Barutzki et al. 2007, Földvári et al. 2016).

Die übrigen Babesien (*B. caballi*, *B. microti*, *B. cf. microti*), die bislang nur außerhalb Deutschlands in *D. reticulatus* gefunden wurden, sind Auslöser verschiedenster Krankheitsbilder in Mensch und Tier (Rothschild 2013, Rožej-Bielicka et al. 2015, Hodžić et al. 2017). Trotz der in Deutschland scheinbar fehlenden Seroprävalenz von *B. caballi* in Pferden (Sigg et al. 2010) und der Meldung von nur einem einzigen autochthonen Fall equiner Babesiose (Scheidemann et al. 2003) ist der Erreger von Bedeutung, da allein positive serologische Befunde zu Transportbeschränkungen oder -verboten führen (Rothschild 2013).

Im Gegensatz zu *B. caballi* wurde für *B. microti* und *B. cf. microti*, welche zunehmend in *D. reticulatus* beschrieben werden, bislang keine Vektorkompetenz belegt (Wójcik-Fatla et al. 2012, Wójcik-Fatla et al. 2015, Hodžić et al. 2017, Zajac et al. 2017). Hohe Prävalenzen von 20-47,5 % von *B. cf. microti* (= *T. annae*) in Füchsen in Deutschland (Brandenburg, Thüringen) (Najm et al. 2014, Liesner et al. 2016) bzw. Ungarn (Farkas et al. 2015) und das Fehlen des entsprechenden Erregers in *D. reticulatus* in diesen Ländern sprechen derzeit jedoch gegen eine Übertragung durch diese Zeckenspezies. Weitere Untersuchungen zur Einschätzung der Relevanz der Zecke im Zusammenhang mit diesen Erregern bleiben abzuwarten. Grundsätzlich wurden jedoch klinische Fälle durch *B. microti*-Infektionen beim Menschen bereits in Deutschland und Polen beschrieben. Unter immunsuppressiven Umständen führte die Infektion sogar zur Ausbildung eines schwerwiegenden Krankheitsbildes (Hildebrandt et al. 2007, Moniuszko-Malinowska et al. 2016). Bezüglich der humanmedizinischen Relevanz ist *B. microti* im Gegensatz zu *B. divergens* jedoch von untergeordneter Bedeutung in Europa (Rožej-Bielicka et al. 2015).

5.4.2 *Borrelia* spp.

Prävalenzen von *Borrelia* spp.

Die Untersuchung aller 2000 Buntzecken ergab eine Prävalenz von 0,25 %. Die Borrelien-infizierten Zecken wurden an allen vier Standorten gefunden. Die Sequenzierung gelang bei zwei Proben und bestätigte Infektionen mit *B. afzelii* und *B. miyamotoi*. Letztere ist nach

aktuellem Kenntnisstand eine Erstbeschreibung in *D. reticulatus*. Die in anderen Studien nur selten durchgeführten Genospeziesbestimmungen detektierten ebenfalls häufig *B. afzelii* (Nijhof et al. 2007, Reye et al. 2013, Mierzejewska et al. 2015b). Tabelle 2 (Kapitel 2.2.2.4) liefert einen generellen Überblick über den Großteil der in Europa und Asien durchgeführten Untersuchungen zu Borrelien in wirtssuchenden *D. reticulatus*. Die im Zuge dieser Studie bestimmte Prävalenz deckt sich mit der Mehrzahl der Untersuchungen in anderen Ländern Europas. Demnach wurden ähnlich niedrige Infektionsraten mit *Borrelia* spp. auch in den Niederlanden (0,47 %; n=215) (Nijhof et al. 2007) und Polen (0,09 %; n=2585) (Mierzejewska et al. 2015b) dokumentiert. Gar keine Funde von Borrelien wurden zudem in wirtssuchenden Buntzecken in Großbritannien (n=61) (Tijssse-Klasen et al. 2013), Spanien (n=97) (Barandika et al. 2008), Polen (n=125) (Opalińska et al. 2016), Tschechien (n=372) (Hubálek et al. 1998), Kroatien (n=100) (Dobec et al. 2009) und Bosnien-Herzegowina (n=54) (Hodžić et al. 2016) beschrieben. Vergleichsweise wenige Studien berichten dagegen von höheren Prävalenzen von 1,5-4,27 % (n=41-634) (Rar et al. 2005a, Bonnet et al. 2013, Reye et al. 2013, Król et al. 2015, Zając et al. 2017). Auch in wirtssuchenden Buntzecken in Deutschland wurden weitaus höhere Prävalenzen von 6 % (n=94) im Raum Berlin (Robert-Koch-Institut 2009) und 11,3 % (n=97) in Sachsen (Kahl et al. 1992) dokumentiert. Richter et al. (2012b) führten den durch Kahl et al. (1992) bestimmten hohen Infektionsgrad auf ein unspezifisches Verhalten des verwendeten IFATs zurück. Eine Beurteilung der durch das Robert-Koch-Institut (2009) publizierten Prävalenz ist aufgrund fehlender Informationen zur Nachweismethode nicht möglich. Andere in Deutschland durchgeführte Untersuchungen in wirtssuchenden *D. reticulatus* konnten ähnlich zu der aktuellen Studie keine Borrelien nachweisen (Richter et al. 2012b, Obiegala et al. 2017). Studien zur Analyse bereits wirtsgebundener Buntzecken sind selten, beschreiben aber häufig ebenso fehlende Prävalenzen von Borrelien (Nijhof et al. 2007, Claerebout et al. 2013, Król et al. 2015). Dahingegen berichteten Biaduń et al. (2007) (n=12, Polen) und Reye et al. (2013) (n=61, Weißrussland) von Infektionsraten von 50 % bzw. 8,2 %. Die entsprechenden Wirte (Cerviden, Kühe, Hunde) der genannten Studien wurden nicht auf mögliche Borrelien-Infektionen untersucht. Immerhin ist das klinische Bild der Borreliose bei Hunden grundsätzlich bekannt. Die hier beprobten Hunde zeigten laut den Autoren keine klinische Symptomatik.

Relevanz für die Tier- und Humangesundheit

Borrelia afzelii stellt einen der bedeutendsten Erreger der humanen Borreliose in Europa dar (Stanek et al. 2012). Die Pathogenität des Erregers ist für Hunde noch nicht ausreichend geklärt (Pantchev et al. 2015). Klinische Erkrankungen durch den Vertreter des Rückfallfieber-Komplexes *B. miyamotoi* wurden bislang ausschließlich im Menschen

(Deutschland, Russland, Japan, USA, Niederlande) beschrieben (Boden et al. 2016, Siński et al. 2016). Ausgehend von den äußerst niedrigen ermittelten Prävalenzen scheint *D. reticulatus* keine wesentliche Rolle in der Epidemiologie dieser beiden Genospezies einzunehmen. Untersuchungen zu einer möglichen Vektorkompetenz von *D. reticulatus* liegen bislang nicht vor, jedoch sprechen verschiedene Hinweise gegen diese Funktion. Demnach fungieren die ebenfalls zur Gattung *Dermacentor* gehörenden Vertreter *D. andersoni*, *D. silvarum* und *D. occidentalis* nachweislich nicht als Vektor für Borrelien (Lane et al. 1994, Dolan et al. 1997, Sun und Xu 2003). Im Gegensatz zum Vektor *I. ricinus* wurden zudem in adulten, experimentell mit *B. garinii* infizierten Buntzecken wenige Tage nach Infektion keine bzw. nur noch immobile Borrelien gefunden und damit die fehlende Fähigkeit zur Aufrechterhaltung einer Borrelien-Infektion belegt (Mátlová et al. 1996, Rudolf und Hubálek 2003). Möglicherweise wird die Infektion durch das Immunsystem von *D. reticulatus* beeinflusst (Mierzejewska et al. 2015b). Immerhin bewirken borreliazidale Plasmafaktoren in der Hämolymphe von *D. marginatus* bzw. *D. variabilis* eine Reduktion der Borrelienzahl (Johns et al. 2001, Chrudimská et al. 2014).

5.4.3 Anaplasmataceae

Prävalenzen von *Cand. Neoehrlichia mikurensis*, *Anaplasma*- und *Ehrlichia* spp.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden Prävalenzen von 0,05 % für Anaplasmen (Sequenzierung: *A. phagocytophilum*) und jeweils 0 % für Ehrlichien bzw. für *Cand. Neoehrlichia mikurensis* ermittelt. Vergleichbare Studien liegen in Deutschland kaum vor. Untersuchungen auf *Anaplasma* spp. und *Cand. Neoehrlichia mikurensis* detektierten eine einzelne infizierte Buntzecke mit dem letztgenannten Erreger in einer zu dieser Studie durchgeführten Parallelstudie in Brandenburg (Richter et al. 2012b, Krücken et al. 2013). Funde von *Cand. Neoehrlichia mikurensis* (7,7 %; n=117) in gesogenen Nymphen gehen möglicherweise auf die aufgenommene Blutmahlzeit der ebenfalls positiv getesteten Wirte zurück (Silaghi et al. 2012b). Zum Vergleich zeigen Untersuchungen in wirtssuchenden Buntzecken in anderen Ländern Europas und Asiens Prävalenzen von 0-25,36 % (Tab. 3, Kapitel 2.2.3.3). Es ist ersichtlich, dass sich die in dieser Studie ermittelte äußerst geringe Prävalenz mit den Ergebnissen nahezu aller gegenwärtig verfügbaren Publikationen deckt. Demnach konnten keine Erreger dieser Gattungen beispielsweise in den Niederlanden (n=215 bzw. 177) (Nijhof et al. 2007, Jahfari et al. 2012), Großbritannien (n=61) (Tijssen-Klasen et al. 2013), Österreich (n=153) (Duscher et al. 2016), Spanien (n=97) (Barandika et al. 2008), Ungarn (n=413) (Hornok et al. 2016), Polen (n=125) (Opalińska et al. 2016), Weißrussland (n=164) (Reye et al. 2013) und Russland (n=91) (Shpynov et al. 2006) nachgewiesen werden. Vereinzelt Funde von Anaplasmen (1,1-8 %; n=53-634) wurden

lediglich in Polen, Litauen, Frankreich, Serbien und Bosnien-Herzegowina beschrieben (Paulauskas et al. 2012, Bonnet et al. 2013, Tomanović et al. 2013, Szekeres et al. 2015, Hodžić et al. 2016, Zając et al. 2017). Von einer ungewöhnlich hohen Prävalenz berichteten zudem Karbowski et al. (2014), wonach 25,36 % (n=205) der im nicht mehr vom Menschen genutzten Gebiet in Tschernobyl untersuchten Buntzecken positiv getestet wurden. In Übereinstimmung mit der aktuellen Studie verdeutlichen auch Untersuchungen von wirtsgebundenen Zecken die geringe Infektionswahrscheinlichkeit von *D. reticulatus* mit den gesuchten Erregern. Die Analysen von Buntzecken, die von Hunden, Katzen, Pferden und Wiederkäuern abgenommen wurden, konnten die entsprechenden Pathogene nicht nachweisen (n=18-164) (Santos-Silva et al. 2006, Nijhof et al. 2007, Claerebout et al. 2013, Hamel et al. 2013, Reye et al. 2013, Ionita et al. 2016, Król et al. 2016b, Potkonjak et al. 2016). Nahezu alle Wirtstiere zeigten keinerlei klinische Symptome. Eine parallele Untersuchung der Wirte auf die Erreger fand nicht statt. Positive Funde wurden jedoch in 6 der 18 von Rindern abgenommenen Zecken-Pools (*A. marginale*) und in 14,3 % der von Cerviden abgenommenen Buntzecken (*A. phagocytophilum*) beschrieben (Wirtgen et al. 2011, Hornok et al. 2012). Die Rinder selbst zeigten Anzeichen einer klinischen Anaplasrose.

In Übereinstimmung mit dem Ergebnis dieser Studie wurden in allen oben genannten Publikationen zur Untersuchung wirtssuchender *D. reticulatus* Anaplasmen, niemals aber Ehrlichien oder *Cand. Neoehrlichia mikurensis* detektiert. Mit Ausnahme von Bonnet et al. (2013) (*A. marginale*) ergab die Speziesbestimmung in den verbleibenden Studien ebenfalls eine Infektion mit *A. phagocytophilum*.

Relevanz für die Tier- und Humangesundheit

Da in Bezug auf *Anaplasma* spp. in wirtssuchenden *D. reticulatus* nahezu ausschließlich Beschreibungen von *A. phagocytophilum* vorliegen, ist in erster Linie die Relevanz dieses Erregers zu diskutieren. *Anaplasma phagocytophilum* hat in Europa als Auslöser der granulozytären Anaplasrose bei Wiederkäuern, aber auch bei Hunden und Menschen klinische Bedeutung (Dugat et al. 2015). In der Epidemiologie der Erkrankung spielt diese Zeckenspezies dennoch keine Rolle, da die bislang nachgewiesenen Prävalenzen äußerst gering waren und keine Hinweise auf eine Vektorfunktion für diesen Erreger nach derzeitigem Kenntnisstand vorliegen. *Anaplasma marginale*, der Auslöser der bovinen Anaplasrose und der einzige durch experimentelle Untersuchungen bestätigte Erreger aus der Gruppe der Anaplasmataceae, für welchen eine Vektorkompetenz durch *D. reticulatus* besteht (Zivkovic et al. 2007), spielt ebenfalls keine Rolle, da dieser keine Verbreitung in wirtssuchenden Buntzecken hat. Darüber hinaus impliziert eine experimentell bestimmte Vektorkompetenz nicht automatisch eine Übertragung unter Feldbedingungen (OIE 2015).

Ehrlichien sind nach aktuellem Kenntnisstand eindeutig nicht an *D. reticulatus* als Vektor gekoppelt, da in Übereinstimmung mit dieser Arbeit entsprechende Erreger dieser Gattung bis heute in keiner einzigen Studie nachgewiesen wurden. Die bedeutendste Ehrlichien-induzierte Erkrankung (canine Ehrlichiose) tritt ausschließlich im Verbreitungsgebiet des scheinbar einzig bekannten Vektors *R. sanguineus* auf (Sainz et al. 2015, Rubel et al. 2016). Demnach ist die canine Ehrlichiose in Deutschland als Reise- und Importkrankheit zu betrachten (Liebisch et al. 2006, Krupka et al. 2007).

Auch *Cand. Neoehrlichia mikurensis* ist grundsätzlich von klinischer Relevanz bei Mensch und Hund (Silaghi et al. 2016), scheint aufgrund der in dieser und vielen weiteren Studien kaum festgestellten Prävalenzen jedoch keine Bedeutung im Zusammenhang mit *D. reticulatus* zu haben. Lediglich in einer aus Deutschland stammenden wirtssuchenden adulten weiblichen Zecke, welche im Rahmen einer zu dieser Studie durchgeführten Parallelstudie detektiert wurde, wurde DNA dieses Erregers nachgewiesen (Krücken et al. 2013). Im Zusammenhang mit positiv getesteten gesogenen Nymphen (Silaghi et al. 2012b) könnte die Möglichkeit einer transstadialen Weitergabe erwogen werden, wobei auf Grundlage einer PCR keine Aussage zur Vitalität des Erregers gemacht werden kann und die Effektivität der Weitergabe aufgrund des Nachweises in nur einer einzelnen wirtssuchenden Zecke fraglich ist.

5.4.4 *Rickettsia* spp.

Prävalenzen von *Rickettsia* spp.

Die im Rahmen dieser Studie in *D. reticulatus* ermittelte Prävalenz von 64 % stellt einen der höchsten Werte im Vergleich zu anderen europäischen Untersuchungen dar (Tab. 4, Kapitel 2.2.6.3). Weitere in Deutschland in wirtssuchenden Buntzecken durchgeführte Studien berichteten von Prävalenzen von 50 % (n=94) bzw. 51,3 % (n=288) im Raum Berlin/Brandenburg und 33,1 % (n=133) bis maximal 70,5 % (n=105) in Mittel- und Süddeutschland (Robert-Koch-Institut 2009, Pluta et al. 2010, Rumer et al. 2011, Silaghi et al. 2011, Obiegala et al. 2017). Hierzulande durchgeführte Untersuchungen in von Hunden und Cerviden abgenommenen adulten Exemplaren ergaben Werte von 23 % bzw. 39 % (Dautel et al. 2006, Schreiber et al. 2014). Im Vergleich zu dieser Studie berichteten fast alle in anderen Ländern Europas durchgeführten Studien von niedrigeren Prävalenzen in wirtssuchenden *D. reticulatus*. Ein definitives geografisches Muster in Bezug auf die Höhe der Rickettsien-Prävalenzen ist jedoch nicht erkennbar, da große Differenzen in der Anzahl infizierter *D. reticulatus* zwischen, aber auch innerhalb verschiedener Länder bestehen. Grundsätzlich wurden jedoch im Baltikum und in Ländern Südeuropas vergleichsweise niedrige Werte mit einer maximalen Prävalenz von 25,8 % (n=115) (Špitalská et al. 2012)

dokumentiert. Weitere Studien in diesen Gebieten beschreiben Infektionsraten von 4,9 % (n=1682) (Radzijeuskaja et al. 2015), 12 % (n=100) (Dobec et al. 2009), 0 % (n=53) (Radulović et al. 2011), 18,5 % (n=54) (Hodžić et al. 2016) und 10,8 % (n=600) (Svehlová et al. 2014). Eine aktuelle Publikation aus der Slowakei belegt hingegen eine Prävalenz von 50,3 % (Špitalská et al. 2018). Untersuchungen in den anderen Gebieten Europas zeigen tendenziell höhere Prävalenzen, welche den in dieser Studie ermittelten Wert jedoch nicht übersteigen. Demnach waren in Polen 41 % (n=541) (Stańczak et al. 2018), 43,8 % (n=634) (Zajac et al. 2017) und 53 % (n=528) (Wójcik-Fatla et al. 2013) der Buntzecken infiziert. In Großbritannien wurden Prävalenzen von 28,8 % (n=59) (Tijssse-Klasen et al. 2011) bzw. 5 % (n=61) (Tijssse-Klasen et al. 2013) ermittelt. Auch andere Studien verdeutlichen mit Infektionsraten von 49,5 % (n=97, Spanien) (Barandika et al. 2008), 34,4 % (n=413, Ungarn) (Hornok et al. 2017), 15,3 % (n=215, Niederlande) (Nijhof et al. 2007) und 10,1 % (n=69, Ukraine) (Didyk et al. 2017) stark variierende, aber vergleichsweise niedrige Werte. Höhere Infektionsraten im Vergleich zu dieser Studie sind lediglich aus Tschernobyl (70,5 %; n=201), wo ebenfalls ungewöhnlich hohe Prävalenzen von *A. phagocytophilum* dokumentiert wurden, und Österreich (65 %; n=153) bekannt (Duscher et al. 2016, Karbowski et al. 2016b). In den Untersuchungen von wirtsgebundenen Buntzecken waren 11,6 % (n=125) bis 60,9 % (n=46) der von Menschen, Hunden, Katzen, Wiederkäuern bzw. Pferden in Spanien, Ungarn, Rumänien, Polen, den Niederlanden, Weißrussland und der Slowakei abgenommenen Zecken infiziert (Fernández-Soto et al. 2006, Nijhof et al. 2007, Špitalská et al. 2012, Hamel et al. 2013, Reye et al. 2013, Ionita et al. 2016, Król et al. 2016b). Nahezu alle diese Zecken wurden von asymptomatischen Wirten abgenommen. Untersuchungen der entsprechenden Wirte auf Rickettsien fanden nicht statt.

Die in der jetzigen Studie durchgeführte Sequenzierung einer Stichprobe von positiven Proben zeigte, dass es sich ausschließlich um Infektionen mit *R. raoultii* handelte. Unter den anderen in Tab. 4 (Kapitel 2.2.6.3) aufgeführten Studien, welche erfolgreich Rickettsien detektierten und die entsprechende Genospezies analysierten, wiesen ca. 90 % ebenfalls *R. raoultii* nach. Vereinzelt traten Fälle von *R. helvetica* und/oder *R. slovaca* auf (Dobec et al. 2009, Špitalská et al. 2012, Tijssse-Klasen et al. 2013, Svehlová et al. 2014, Radzijeuskaja et al. 2015, Hodžić et al. 2016, Rudolf et al. 2016, Hornok et al. 2017). In Übereinstimmung mit den hier vorgelegten Untersuchungen wurde in Deutschland lediglich *R. raoultii* detektiert.

Einflussfaktoren auf die Rickettsien-Prävalenz

Im generalisierten linearen Regressionsmodell (logistische Regression) wurde der signifikante Einfluss des Parameters Fangort verdeutlicht, welcher in unterschiedlich hohen Rickettsien-Prävalenzen an den Standorten resultierte (31,4-78,3 %; σ 2010/2011). In Übereinstimmung mit dieser Studie wurden hohe Prävalenzdifferenzen zwischen nahe

gelegenen Gebieten u. a. auch durch Stańczak (2006) (20-55 %), Silaghi et al. (2011) (37,5-80,1 %) und Stańczak et al. (2016) (23,9-66,7 %) beschrieben. Da die Infektionsökologie von *R. raoultii*, wie im Folgenden erläutert wird, nicht vollständig geklärt scheint (Karbowiak et al. 2016a), sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Gründe der Prävalenzdifferenzen ausreichend zu erörtern. Durch eine effektive transstadiale (98 %) und transovarielle (90 %) Übertragungsrate von *R. raoultii* fungiert *D. reticulatus* grundsätzlich selbst als Reservoir (Samoylenko et al. 2009, Alberdi et al. 2012). Der dennoch bestehende generationsfortschreitende Erregerverlust könnte durch die Interaktion mit Wirten kompensiert werden, welche aufgrund ihrer unterschiedlichen Kompetenz und Kapazität Schwankungen in den Prävalenzen verschiedener Habitats hervorrufen. Die Reservoirkompetenz beinhaltet zum einen die Attraktivität eines Wirtes für den Vektor, welche wiederholte Zeckeninfestationen zulässt. Zum anderen umfasst dieser Begriff die Empfänglichkeit des Wirtes für das Pathogen, die Aufrechterhaltung der Infektion für einen längeren Zeitraum sowie die Fähigkeit, den Erreger anschließend an Vektorzecken weiterzugeben. Die Reservoirkapazität wiederum bezeichnet den Anteil infizierter Zecken in der Zeckenpopulation, zu der ein Wirt im Verhältnis zu anderen Wirten beiträgt. Sie umfasst die Abundanz des Wirtes, die Abundanz der Zecken auf diesem Wirt, die Prävalenz des Erregers in dem Wirt und die Infektiosität des Wirtes für Vektorzecken (Richter und Matuschka 2012b). Eine hohe Kapazität kompetenter Wirte würde eine Reservoirfähigkeit darstellen und folglich die Wahrscheinlichkeit einer Rickettsienübertragung erhöhen. Eine hohe Biodiversität, welche möglicherweise mit einer höheren Anzahl nicht kompetenter Wirte einhergeht, würde hingegen gegenteilig wirken, wie anhand von Untersuchungen an Lyme Borrelien diskutiert wird (Ostfeld 2009, Wood und Lafferty 2013, Turney et al. 2014). Da reservoirbezogene Untersuchungen von Wirten in Bezug auf *R. raoultii* kaum vorliegen und bislang keine Wirbeltierreservoirs bekannt sind, sollten weitere und insbesondere xenodiagnostische Untersuchungen durchgeführt werden (Karbowiak et al. 2016a). Die Rolle von Kleinsäugetieren scheint jedoch nicht von Bedeutung, da Untersuchungen in Deutschland zeigen, dass trotz niedriger Prävalenzen von *R. raoultii* in Wald- und Rötelmäusen (25 %) eine große Anzahl an wirtssuchenden Buntzecken (70,5 %) in diesem Gebiet infiziert war (Obiegala et al. 2017). Ein weiterer Ansatzpunkt könnte die Beeinflussung der Rickettsien-Prävalenz über das Co-feeding darstellen. Unabhängig von einer systemischen Infektion eines Wirtes genügt beim Co-feeding das zeitgleiche Saugen von Zecken an ein und demselben Wirt für den Erregeraustausch (Randolph et al. 1996). Untersuchungen zur erfolgreichen Erregertransmission mittels Co-feeding liegen bereits für *R. conorii* und *R. massiliae* vor (Matsumoto et al. 2005, Zemtsova et al. 2010). Entsprechend Brunner und Ostfeld (2008) sowie Pfäffle et al. (2015) bewirkt eine geringe Wirtsdichte eine erhöhte Anzahl zeitgleich saugender Zecken am Wirtstier und umgekehrt. Folglich könnte eine

geringe Wirtsdichte bzw. eine hohe Kapazität die Wahrscheinlichkeit der Rickettsienübertragung über das Co-feeding steigern. Ein wiederum anderer Ansatzpunkt könnte im Vorkommen von zooprophyllaktischen Wirten, welche eine Reduktion der Erregerprävalenz bewirken könnten, liegen. Entsprechende Untersuchungen existieren zu Borrelien (Richter und Matuschka 2010), bislang aber nicht zu Rickettsien.

Im Gegensatz zu dem habitatsbedingten Einfluss konnte mithilfe des Regressionsmodells keine signifikante Bedeutung für die zeitbezogenen Parameter Jahr und Saison ermittelt werden. Der Vergleich wirtssuchender Rickettsien-infizierter *D. reticulatus* in einer spanischen Studie verdeutlicht einen ebenfalls fehlenden signifikanten Einfluss der Variable Saison auf die Prävalenzhöhe (Barandika et al. 2008). Hornok et al. (2017) beschrieben signifikante Prävalenzunterschiede bei Betrachtung verschiedener Monate an ein und demselben Standort und gibt Differenzen bis zu 31 % an. Entsprechende Schwankungen zwischen den Monaten wurden auch in der hiesigen Studie dokumentiert. Demnach waren beispielsweise im April 2011 am Standort Gatow mit 20 % (n=40) Rickettsien-positiv getesteter Buntzecken 23,9 % Exemplare weniger infiziert als im September (n=41). Beim Vergleich der Monatsprävalenzen in Abhängigkeit von Standort und Untersuchungsjahr waren jedoch keinerlei Tendenzen erkennbar. Schlussfolgernd sollten zur Bestimmung der lokalen Prävalenz Langzeituntersuchungen aufgrund der teils massiven Schwankungen erfolgen (Hornok et al. 2017).

Relevanz für die Tier- und Humangesundheit

Dermacentor reticulatus gilt als Überträger von *R. raoultii* und *R. slovaca* (Földvári et al. 2013), wobei die in diesem Kapitel im Absatz „Prävalenzen von *Rickettsia* spp.“ aufgelisteten bisherigen Untersuchungen die weitaus größere Bedeutung von *R. raoultii* im Zusammenhang mit dieser Zeckenspezies aufzeigen. Nach bisherigem Kenntnisstand spielt der Erreger unter tiermedizinischen Gesichtspunkten keine Rolle, allerdings liegen diesbezüglich nur wenige Untersuchungen in Wirten vor. Lediglich Wächter et al. (2015) und Liesner et al. (2016) konnten *R. raoultii* mit einer Prävalenz von 0,68-2,8 % serologisch bzw. direkt (PCR) in asymptomatischen Hunden nachweisen. Interessanterweise liegen die Untersuchungen von Liesner et al. (2016) und die von Schreiber et al. (2014) durchgeführte Studie, welche Prävalenzen von *R. raoultii* von 39 % in von Hunden abgenommenen *D. reticulatus* detektierten, wie auch die aktuell vorliegende Untersuchung alle im Gebiet Berlin/Brandenburg. Entsprechend Beck et al. (2014) ist *D. reticulatus* in dieser Region zudem nahezu gleich häufig auf Hunden zu finden wie *I. ricinus*. Die stark divergierenden Infektionsgrade der Hunde und Buntzecken mit *R. raoultii* lassen vermuten, dass eine Übertragung des Erregers auf den Hund nicht erfolgreich stattfindet, Hunde für *R. raoultii*

nicht empfänglich sind oder der Nachweis von Erregermaterial bzw. Antikörper nur schwer möglich ist.

Für die Humanmedizin sind *R. raoultii*, aber auch *R. slovaca*, als Auslöser der SENLAT von medizinischer Relevanz. Trotz hoher Prävalenzen von *R. raoultii* in den Buntzecken liegen bislang nur geringe Seroprävalenzen und nur vereinzelte Erkrankungsfälle vor. Prävalenzuntersuchungen, welche *R. raoultii* umfassen und eine eindeutige Genospeziesdifferenzierung zulassen, sind jedoch auch im Humanbereich selten. Zajac et al. (2013) und Stańczak et al. (2016) berichteten von Seroprävalenzen mit *Rickettsia* spp. von 4,7-36 %, wobei stark exponierte Gruppen wie z. B. Waldarbeiter besonders hohe Prävalenzen aufwiesen. Wölfel et al. (2017) ermittelten im Raum Berlin/Brandenburg eine Prävalenz von 23,5 %, wovon 2/3 der Proben einer Genospeziesbestimmung unterzogen wurden. *R. raoultii* machte einen Anteil von 5 % aus. Obwohl in der aktuellen Untersuchung eine der höchsten Prävalenzen in *D. reticulatus* überhaupt ermittelt wurde, entstammen Erkrankungsfälle in Deutschland bislang lediglich dem süddeutschen Raum. Allerdings konnte in diesen Fällen eine Abgrenzung zur morphologisch überaus ähnlichen Zecke *D. marginatus* als Überträger nicht vorgenommen werden (Pluta et al. 2009, Rieg et al. 2011). Die Gründe der niedrigen Fallzahlen liegen möglicherweise in einer Unterdiagnostizierung der SENLAT-Erkrankung, da serologische Kreuzreaktionen zu anderen Vertretern der Fleckfiebergruppe bzw. die geringe Nachweisbarkeit in Blut und Gewebeproben mittels PCR die Detektion und Zuordnung des Erregers erschweren (Silva-Pinto et al. 2014). Zum anderen ist die vergleichsweise geringe Wirtspräferenz von *D. reticulatus* gegenüber dem Menschen von ausschlaggebender Bedeutung, wobei in endemischen Gebieten das Risiko dennoch nicht unterschätzt werden sollte (Földvári et al. 2016). Auch ist eine mögliche Übertragung durch männliche Exemplare zu berücksichtigen (Földvári et al. 2013). Weiterhin wird die Pathogenität von *R. raoultii* intensiv diskutiert. Während einige Autoren *R. raoultii* eine ebenso so große Pathogenität wie *R. slovaca* zuschreiben (Świtaj et al. 2012, Földvári et al. 2013), gehen wiederum andere von weniger schweren Krankheitsbildern aus (Parola et al. 2009, Silva-Pinto et al. 2014). Darüber hinaus gingen Infektionen, in denen der ursächliche Erreger genau identifiziert werden konnte, in 85 % der Fälle von *R. slovaca* aus (Silva-Pinto et al. 2014).

5.5 Schlussfolgerungen

Diese Arbeit gibt einen umfassenden Überblick zur saisonalen Aktivität adulter wirtssuchender *D. reticulatus* sowie zu den Prävalenzen verschiedenster, human- oder veterinärmedizinisch relevanter, zeckenübertragener Erreger im Raum Berlin/Brandenburg und bildet damit eine wichtige Grundlage zur Risikobewertung. Im Gegensatz zu Studien zur

Diskussion

Untersuchung bereits gesogener Zecken, in denen der jeweilige Erregernachweis z. T. auf die aufgenommene Blutmahlzeit zurückzuführen ist, wird durch die Analyse noch wirtssuchender Zecken eine verlässlichere Erregerprävalenz in der Zeckenpopulation wiedergegeben.

Mithilfe der Fahnen-Flaggen-Methode wurden stabile Buntzeckenpopulationen auf den ausgewählten brachliegenden Flächen im Raum Berlin/Brandenburg bestätigt. Neben den charakteristischen Aktivitäten im Frühjahr und Herbst, wurden bei vereinzelt Probennahmen in den Wintermonaten ebenfalls aktive adulte *D. reticulatus* gesammelt, deren Anzahl jedoch sehr hohen Schwankungen unterlag. Umfangreiche Untersuchungen, welche dem Winter entsprechende Faktoren (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Tageslänge, Schneedecke) berücksichtigen, sollten zur besseren Beurteilung der Winteraktivität durchgeführt werden. Orientierung könnte die von Dautel et al. (2008) durchgeführte Studie zur Beobachtung der Winteraktivität von *I. ricinus* mithilfe der Stabmethode bieten. Grundsätzlich ist damit ein potentielles Infestationsrisiko der Wirte auch in dieser Zeit gegeben. Daher sollte in endemischen Gebieten eine ganzjährige Zeckenprophylaxe in Erwägung gezogen werden.

Zur Einschätzung der die Aktivität von *D. reticulatus* beeinflussenden Faktoren wurden mit den im Regressionsmodell untersuchten Variablen die wichtigsten Parameter erfasst und die signifikante Bedeutung des Fangortes, der Saison und der Temperatur herausgestellt. Letztere umfassen zwar Faktoren wie die Tageslichtlänge und die Vegetations- und Wirtsstruktur, allerdings wäre eine separate Betrachtung dieser Parameter von großem Interesse. Dadurch könnten die Ursachen der signifikanten Unterschiede zwischen den Saisons und den Fangorten genauer definiert und generelle Erkenntnisse über Einflussfaktoren auf die Buntzeckenaktivität ausgebaut werden. Die fehlende Bestimmung anderer Parameter, wie die Windgeschwindigkeit und die Niederschlagsmenge, ist vernachlässigbar, da bisherige Untersuchungen keinen Einfluss feststellen konnten (Hubálek et al. 2003a, Leschnik et al. 2008, Kiewra et al. 2014, Olivieri et al. 2017) bzw. die Untersuchung mittels Flaggen-Methode bei stürmischen und nassen Bedingungen nicht geeignet wäre. Anhand von *I. ricinus* wurde zudem gehäuft von einem bedeutenden Einfluss des Sättigungsdefizites berichtet (Randolph et al. 1999, Perret et al. 2003, Kiewra et al. 2014). In einer jüngsten Studie in Norditalien konnte der Effekt des Sättigungsdefizites auf adulte Buntzecken ebenfalls herausgestellt werden (Olivieri et al. 2017). Die Beurteilung der Aktivität kann in diesem Zusammenhang jedoch durch Verwendung der Parameter Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit allein erfolgen, da sich das Sättigungsdefizit aus diesen beiden Faktoren zusammensetzt. Darüber hinaus bildet die relative Luftfeuchtigkeit in Anlehnung an den CEA die ausschlaggebende Variable für die Regulation des

Wasserhaushaltes und zeigt, dass Zecken oberhalb des CEA unabhängig von der Höhe des Sättigungsdefizites aktiv sind (Estrada-Peña et al. 2013b).

In Anbetracht der hohen Zeckenaktivität in den untersuchten Gebieten war die Untersuchung auf verschiedene Krankheitserreger von großer Bedeutung. Aufgrund der Wirtspräferenz adulter Buntzecken war die Analyse von Erregern, welche Hunde, Pferde und Rinder betreffen, von primärem Interesse. Aber auch humanpathogene Keime durften aufgrund der wiederholten Berichte von Buntzeckenstichen am Menschen nicht außer Acht gelassen werden (Grzeszczuk und Stanczak 2006, Lledó et al. 2014, Chitimia-Dobler 2015, Jongejan et al. 2015). Im Ergebnis wurde eine der höchsten jemals beschriebenen Rickettsien-Prävalenzen ermittelt, wobei ausschließlich *R. raoultii* nachgewiesen wurde. Diesem Erreger sollte auf Basis der hohen Prävalenz in *D. reticulatus* und seiner bereits erwiesenen humanmedizinischen und noch fraglichen tiermedizinischen Relevanz durchaus Bedeutung beigemessen werden. Im Gegensatz dazu scheinen die untersuchten Buntzeckenpopulationen aktuell keine Rolle für Babesien, Anaplasmen, Ehrlichien, *Cand. Neoehrlichia mikurensis* und Borrelien zu spielen. Aufgrund wiederholt beschriebener vereinzelter autochthoner Fälle der klinisch sehr bedeutenden caninen Babesiose in dieser Region, sollten bezüglich möglicher Babesien-Infektionen jedoch weitere Zeckenscreenings erfolgen, wobei die Aufenthaltsorte der betroffenen Hunde zur Beprobung berücksichtigt werden sollten.

Die erhobenen Daten liefern einen grundlegenden Beitrag zur Risikoeinschätzung für Mensch und Tier. Für eine endgültige Risikobewertung sind neben dem Vorkommen, dem saisonalen Verhalten und der Erregerlast von *D. reticulatus* aber auch Faktoren wie die Kontaktwahrscheinlichkeit zwischen Zecke und Wirt, die Wirtspräferenz, das Vektorpotential der Zecke, die Pathogenität des jeweiligen Erregers, die Prävalenzgrade in den Wirten selbst und Inzidenzen für einzelne Erkrankungen notwendig. Auch liefert diese Studie ausschließlich einen Status quo für den untersuchten Zeitraum. Insbesondere Tierbewegungen zwischen den Ländern bergen das Risiko der Erregereinschleppung und gegebenenfalls der Etablierung gebietsfremder Erreger in den hiesigen stabilen Vektorpopulationen. So wurden nicht wenige der Reise- und Importhunde bzw. der illegal gehandelten Hunde in indirekten als auch in direkten Nachweisverfahren für zahlreiche Erreger positiv getestet (Menn et al. 2010, Hamel et al. 2011, Naucke 2011, Fitz-Rathgen 2016). Die Erfassung von Veränderungen in den Zeckenpopulationen und in ihren Infektionsgraden mit bislang bekannten Erregern, aber auch die Entdeckung neuer Pathogene in *D. reticulatus*, wie in dieser bzw. in der von Hodžić et al. (2017) erstellten Studie anhand von *B. miyamotoi* bzw. *B. cf. microti* beschrieben wurde, können daher nur durch wiederholte Untersuchungen der Buntzecken gewährleistet werden.

6 Zusammenfassung

Untersuchungen zur saisonalen Aktivität der Buntzecke *Dermacentor reticulatus* im Umland von Berlin und Bestimmung assoziierter Pathogene

Zeckenübertragene Krankheitserreger gewinnen sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin zunehmend an Bedeutung. In Europa ist *Dermacentor reticulatus* die zweithäufigste Zeckenart nach *Ixodes ricinus*. Durch die Schaffung geeigneter Habitats, durch die im Rahmen der Globalisierung steigenden Tierbewegungen und dem Klimawandel wird die weitere geografische Ausbreitung der Zeckenspezies beobachtet. *Dermacentor reticulatus* ist als Vektor verschiedener, insbesondere veterinärmedizinisch bedeutender Pathogene von großer Relevanz.

Zur Einschätzung des von *D. reticulatus* ausgehenden Risikopotentials im Raum Berlin/Brandenburg wurde im Rahmen dieser Dissertation sowohl die saisonale Aktivität als auch die Häufigkeit verschiedener Erreger in adulten Buntzeckenpopulationen untersucht. Dazu wurden vier verschiedene Standorte im Umland von Berlin (Güterfelde, Gatow, Falkenberg, Königs Wusterhausen) im Zeitraum März 2010 bis November 2011 in einem zweiwöchigen Intervall unter Verwendung der Flaggen-Methode beprobt. Mit insgesamt 8166 gesammelten Exemplaren stellte *D. reticulatus* gegenüber 1020 geflaggten *I. ricinus* die dominierende Zeckenspezies dar. Sämtliche Buntzecken waren adult und an allen Standorten wurde ein signifikant höheres Vorkommen weiblicher Vertreter dokumentiert. *Dermacentor reticulatus* zeigte an allen Standorten und in beiden Sammeljahren ein charakteristisches bimodales Aktivitätsmuster. Demnach erstreckten sich die Zeiträume stabiler Zeckenaktivitäten von März bis Mitte/Ende Mai und von Mitte August bis November. Während der Sommermonate wurde ein nahezu kompletter Rückgang der Buntzeckenaktivität beobachtet. Probennahmen zum Jahresbeginn 2011 sowie zusätzliche Beprobungen von Dezember 2011 bis April 2012 am Standort Güterfelde verdeutlichten eine, wenn auch hohen Schwankungen unterliegende, Aktivität von *D. reticulatus* während der Wintermonate. Potentielle Einflüsse auf die Zeckenaktivität wurden durch die multivariate Analyse der Parameter Standort, Jahr, Saison, Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit in einer Negativ-Binomial-Regressionsanalyse überprüft. Im Ergebnis zeigte sich der signifikante Einfluss der Variablen Standort, Saison und Temperatur auf die Buntzeckenaktivität. Die Temperatur wirkte dabei in Abhängigkeit von ihrer Höhe unterschiedlich auf die Aktivität von *D. reticulatus*: die Zahl aktiver Zecken nahm mit zunächst steigenden Temperaturen zu und fiel ab Erreichen eines Temperaturoptimums von 14,03 °C wieder ab.

Zusammenfassung

Aus der Gesamtanzahl gesammelter Buntzecken wurde eine Stichprobe von 2000 adulten weiblichen Exemplaren mithilfe verschiedener PCR-Verfahren auf *Babesia* spp., *Borrelia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* und *Rickettsia* spp. untersucht. Mit Ausnahme der Rickettsien lagen nur geringe Erregerprävalenzen in *D. reticulatus* vor. Gerade einmal 0,05 % (95 % Konfidenzintervall [95 % KI]: 0,01-0,28 %) und 0,25 % (95 % KI: 0,11-0,58 %) der Zecken beherbergten Anaplasmen bzw. Borrelien. In keinem einzigen Exemplar wurden Babesien, Ehrlichien bzw. *Cand. Neoehrlichia mikurensis* detektiert (0 %; 95 % KI: 0-0,14 %). Die Sequenzierung der positiven Proben verdeutlichte eine Infektion mit *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia afzelii* und *Borrelia miyamotoi*. Letzterer Befund gilt als Erstbeschreibung in *D. reticulatus*. Die Rickettsien-Prävalenz erreichte mit insgesamt 64,0 % (95 % KI: 61,9-66,1 %) eine der höchsten jemals in *D. reticulatus* beschriebenen Werte. Die Sequenzierung einer Stichprobe positiv getesteter Proben ergab die Infektion mit *Rickettsia raoultii*. Am Standort Gatow waren mit 31,4 % wesentlich weniger Zecken mit Rickettsien infiziert als in den drei verbleibenden Gebieten, welche Prävalenzen von 71,5-78,3 % aufwiesen. Die im generalisierten linearen logistischen Regressionsmodell durchgeführte Beurteilung möglicher Einflüsse durch die Parameter Standort, Jahr und Saison zeigte, dass ausschließlich die Standorte von signifikanter Bedeutung in Bezug auf die Prävalenzhöhe sind.

Die Untersuchungen verdeutlichen das Vorkommen stabiler *D. reticulatus*-Populationen in den untersuchten Gebieten am Berliner Stadtrand und dessen Umland, welche z. T. auch als Naherholungsgebiete genutzt werden. Darüber hinaus sollte ein mögliches Infestationsrisiko durch infizierte Zecken auch in der kalten Jahreszeit ins Bewusstsein der Menschen gerufen werden und unter Umständen eine ganzjährig durchzuführende Zeckenprophylaxe empfohlen werden. Der in den untersuchten Populationen primär detektierte Erreger *R. raoultii* ist bezüglich möglicher klinischer Folgen in der Veterinärmedizin nicht ausreichend untersucht, in der Humanmedizin gilt er jedoch als Auslöser der SENLAT-Erkrankung. Die Studie liefert damit einen grundlegenden Beitrag zur Risikoeinschätzung hinsichtlich des Zeckenbefalls sowie der durch Buntzecken übertragenen Krankheitserreger in der Region Berlin/Brandenburg.

7 Summary

Investigation of the seasonal activity of the ornate tick *Dermacentor reticulatus* in the Berlin area and analyses of associated pathogens

Tick-borne pathogens increasingly gain importance in human and veterinary medicine. In Europe, *Dermacentor reticulatus* is the second most abundant tick species after *Ixodes ricinus*. An increasing geographic distribution of the tick species is observed due to the creation of appropriate habitats, enhanced transport of animals in the context of globalisation and climate change. *Dermacentor reticulatus* plays an important role in the transmission of different pathogens, especially in the field of veterinary medicine.

To assess the risk posed by *D. reticulatus* in the area of Berlin/Brandenburg this study focused on the investigation of the seasonal activity and the prevalence of different pathogens in this tick species. For this purpose, four periurban study sites around Berlin (Güterfelde, Gatow, Falkenberg, Königs Wusterhausen) were sampled biweekly using the flagging method in the period from March 2010 to November 2011. In comparison to *I. ricinus* (n=1020), *D. reticulatus* (n=8166) represented the dominant tick species. All collected *D. reticulatus* were exclusively identified as adult individuals. Moreover, a significantly higher proportion of female than male ticks were recognised at every sampling site. The tick species demonstrated a characteristic bimodal pattern of activity at every sampling site and year. Periods of high tick activity were observed from March to mid/end of May and from August to November. During summer months, the activity of ticks almost completely vanished. Sampling at the beginning of the year 2011 and additional samplings from December 2011 to April 2012 at the study site Güterfelde demonstrated tick activity even during winter months, although high variations in tick numbers were recorded. To identify potential impacts on tick activity by different variables (sampling site, year, season, temperature, relative humidity), multivariate analysis was performed using negative binomial regression analysis. As a result, tick activity was significantly influenced by the factors sampling site, season and temperature. The effect of temperature on the number of questing *D. reticulatus* differed depending on its level: up to an optimum value of 14.03 °C, tick activity increased with rising temperatures while tick activity declined with further temperature increase.

Out of all of collected ticks, a subset of 2000 female *D. reticulatus* was analysed for the presence of *Babesia* spp., *Borrelia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Candidatus* *Neoehrlichia mikurensis* and *Rickettsia* spp. using different PCR assays. With the exception of *Rickettsia*, only low prevalences were documented. As few as 0.05 % (95 % confidence interval [95 % CI]: 0.01-0.28 %) and 0.25 % (95 % CI: 0.11-0.58 %) of ticks harboured *Anaplasma* spp. or *Borrelia* spp., respectively. The pathogens *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp.

Summary

and *Cand. Neoehrlichia mikurensis* were not detected (0 %, 95 % CI: 0-0.14 %). Sequencing of positive samples revealed *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia afzelii* or *Borrelia miyamotoi*. To the best of the author's knowledge, this is the first description of *B. miyamotoi* in *D. reticulatus*. The overall prevalence of *Rickettsia* (64 %, 95 % CI: 61.9-66.1 %) is one of the highest that has ever been described before in *D. reticulatus*. Sequencing of a subset of positive samples showed an infection with *Rickettsia raoultii*. With 71.5-78.3 % *Rickettsia*-infected ticks collected in Güterfelde, Falkenberg and Königs Wusterhausen, local prevalence were higher compared to only 31.4 % in Gatow. Using a general linearized logistic regression model, the factors sampling site, year and season were analysed for potential influences on prevalence of *Rickettsia* pathogens. Only the sampling site significantly affected the prevalence.

The study revealed endemic populations of *D. reticulatus* in the investigated sub-urban areas in and around the city of Berlin. Some of the sampling sites are even used as recreational areas. Moreover, people have to be aware about the potential risk of infestation by ticks even in colder periods of the year. Consequently, an appropriate tick prophylaxis throughout the year should be recommended. The relevance of the predominantly found pathogen *R. raoultii* has so far not been sufficiently investigated in veterinary medicine. However, in humans *R. raoultii* is described as the etiologic agent of SENLAT. Based on the results of this study, essential information was generated to assess the risk of *D. reticulatus* and pathogens transmitted by this tick in the area of Berlin/Brandenburg.

8 Literaturverzeichnis

Zeitschriftentitelabkürzungen in nachfolgenden Quellenangaben erfolgten gemäß:

List of journals indexed in Index Medicus.

Bethesda, MD: National Library of Medicine

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=journals>

- Adeolu, M., Gupta, R. S. (2014). A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus *Borrelia* into two genera: the emended genus *Borrelia* containing only the members of the relapsing fever *Borrelia*, and the genus *Borrelia* gen. nov. containing the members of the Lyme disease *Borrelia* (*Borrelia burgdorferi* sensu lato complex). *Antonie Van Leeuwenhoek*. 105(6): 1049-1072.
- Alberdi, M. P., Nijhof, A. M., Jongejan, F., Bell-Sakyi, L. (2012). Tick cell culture isolation and growth of *Rickettsia raoultii* from Dutch *Dermacentor reticulatus* ticks. *Ticks Tick Borne Dis*. 3(5-6): 349-354.
- Alho, A. M., Pita, J., Amaro, A., Amaro, F., Schnyder, M., Grimm, F., Custódio, A. C., Cardoso, L., Deplazes, P., de Carvalho, L. M. (2016). Seroprevalence of vector-borne pathogens and molecular detection of *Borrelia afzelii* in military dogs from Portugal. *Parasit Vectors*. 9(1): 225.
- Allsopp, M. T. E. P., Lewis, B. D., Penzhorn, B. L. (2007). Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. *Vet Parasitol*. 148(2): 130-136.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215(3): 403-410.
- Andréasson, K., Jönsson, G., Lindell, P., Gülfe, A., Ingvarsson, R., Lindqvist, E., Saxne, T., Grankvist, A., Wennerås, C., Marsal, J. (2015). Recurrent fever caused by *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in a rheumatoid arthritis patient treated with rituximab. *Rheumatology (Oxford)*. 54(2): 369-371.
- Atif, F. A. (2015). *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitol Res*. 114(11): 3941-3957.
- Aubry, P., Geale, D. W. (2011). A Review of Bovine Anaplasmosis. *Transbound Emerg Dis*. 58(1): 1-30.
- Babos, S. (1964). Genus: *Dermacentor* Koch, 1844. In: *Die Zeckenfauna Mitteleuropas*. Budapest, Akadémiai Kiadó. S. 334-51.
- Badawi, A., Shering, M., Rahman, S., Lindsay, L. R. (2017). A systematic review and meta-analysis for the adverse effects, immunogenicity and efficacy of Lyme disease vaccines: Guiding novel vaccine development. *Can J Public Health*. 108(1): e62-e70.
- Bajer, A., Rodo, A., Alsarraf, M., Dwuznik, D., Behnke, J. M., Mierzejewska, E. J. (2017). Abundance of the tick *Dermacentor reticulatus* in an ecosystem of abandoned meadows: Experimental intervention and the critical importance of mowing. *Vet Parasitol*. 246: 70-75.
- Baldrige, G. D., Scoles, G. A., Burkhardt, N. Y., Schloeder, B., Kurtti, T. J., Munderloh, U. G. (2009). Transovarial transmission of *Francisella*-like endosymbionts and *Anaplasma phagocytophilum* variants in *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*. 46(3): 625-632.
- Barandika, J. F., Hurtado, A., García-Sanmartín, J., Juste, R. A., Anda, P., García-Pérez, A. L. (2008). Prevalence of tick-borne zoonotic bacteria in questing adult ticks from northern Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 8(6): 829-835.
- Barbour, A. G., Adeolu, M., Gupta, R. S. (2017). Division of the genus *Borrelia* into two genera (corresponding to Lyme disease and relapsing fever groups) reflects their

- genetic and phenotypic distinctiveness and will lead to a better understanding of these two groups of microbes (Margos et al. (2016) There is inadequate evidence to support the division of the genus *Borrelia*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. doi: 10.1099/ijsem.0.001717). Int J Syst Evol Microbiol. 67(6): 2058-2067.
- Barbour, A. G., Hayes, S. F. (1986). Biology of *Borrelia* species. Microbiol Rev. 50(4): 381-400.
- Barth, C., Straubinger, R. K., Sauter-Louis, C., Hartmann, K. (2012). Prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* and their clinical relevance in dogs in Munich, Germany. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 125(7-8): 337-344.
- Bartosik, K., Wiśniowski, L., Buczek, A. (2011). Abundance and seasonal activity of adult *Dermacentor reticulatus* (Acari: Amblyommidae) in eastern Poland in relation to meteorological conditions and the photoperiod. Ann Agric Environ Med. 18(2): 340-344.
- Bartosik, K., Wiśniowski, L., Buczek, A. (2012). Questing behavior of *Dermacentor reticulatus* adults (Acari: Amblyommidae) during diurnal activity periods in eastern Poland. J Med Entomol. 49(4): 859-864.
- Barutzki, D., Reule, M., Scheunemann, R., Heile, C., Schein, E. (2007). Die Babesiose des Hundes - Eine autochthone Erkrankung in Deutschland. Deutsches Tierärzteblatt. 3: 284-292.
- Bauch, R. J., Danner, G. (1988). The discovery of *Dermacentor reticulatus* (Ixodida, Ixodidae) in the East German districts of Leipzig and Halle. Angew Parasitol. 29(4): 250-254.
- Beck, S., Schreiber, C., Schein, E., Krücken, J., Baldermann, C., Pachnicke, S., von Samson-Himmelstjerna, G., Kohn, B. (2014). Tick infestation and prophylaxis of dogs in northeastern Germany: a prospective study. Ticks Tick Borne Dis. 5(3): 336-342.
- Beelitz, P., Schumacher, S., Marholdt, F., Pfister, K., Silaghi, C. (2012). The prevalence of *Babesia canis canis* in marsh ticks (*Dermacentor reticulatus*) in the Saarland. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 125(3-4): 168-171.
- Belozеров, V. N. (1982). Diapause and Biological Rhythms in Ticks. In: Physiology of Ticks. Obenchain, F. D. und Galun, R., Hrsg., Pergamon Press. ISBN: 0-08-024937-X. S. 469-500.
- Berthová, L., Slobodník, V., Slobodník, R., Olekšák, M., Sekeyová, Z., Svitálková, Z., Kazimírová, M., Špitalská, E. (2016). The natural infection of birds and ticks feeding on birds with *Rickettsia* spp. and *Coxiella burnetii* in Slovakia. Exp Appl Acarol. 68(3): 299-314.
- Berzina, I., Capligina, V., Baumanis, V., Ranka, R., Cirule, D., Matise, I. (2013). Autochthonous canine babesiosis caused by *Babesia canis canis* in Latvia. Vet Parasitol. 196(3-4): 515-518.
- Berzina, I., Matise, I. (2013). Seroprevalence against *Borrelia burgdorferi* sensu lato and occurrence of antibody co-expression with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Latvia. Ir Vet J. 66(1): 9.
- Bhide, M., Travnicek, M., Curlik, A., Stefancikova, A. (2004). The importance of dogs in eco-epidemiology of Lyme borreliosis: a review. Vet Med (Praha). 49(4): 135-142.
- Biaduń, W. (2011). New Habitats of *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) in the Lublin Region. Pol J Environ Stud. 20(2): 263-266.
- Biaduń, W., Ryzymowska, J., Stępień-Rukasz, H., Niemczyk, M., Chybowski, J. (2007). Occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks collected from roe deer and deer shot in the south-east of Poland. Bull Vet Inst Pulawy 51(2): 213-217.
- Biesiada, G., Czepiel, J., Leśniak, M. R., Garlicki, A., Mach, T. (2012). Lyme disease: review. Arch Med Sci. 8(6): 978-982.
- Bjarnadóttir, L. (2007). A seroepidemiological survey for antibodies to *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs in Iceland. Hovedopgave, Fagdyrlægeuddannelsen vedr. Hund og Kat. 21 Seiten.
- Bjöersdorff, A., Berglund, J., Kristiansen, B. E., Söderström, C., Eliasson, I. (1999). Varying clinical picture and course of human granulocytic ehrlichiosis. Twelve Scandinavian cases of the new tick-borne zoonosis are presented. Lakartidningen. 96(39): 4200-4204.

- Blanco, J. R., Oteo, J. A. (2002). Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 8(12): 763-772.
- Boden, K., Lobenstein, S., Hermann, B., Margos, G., Fingerle, V. (2016). *Borrelia miyamotoi*-Associated Neuroborreliosis in Immunocompromised Person. *Emerg Infect Dis.* 22(9): 1617-1620.
- Bogdaszewska, Z. (2004). Range and ecology of *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) in Mazuria focus. III. The influence of temperature and day length on the activity of hungry adult ticks in laboratory conditions. *Wiad Parazytol.* 50(4): 739-745.
- Bonnet, S., de la Fuente, J., Nicollet, P., Liu, X., Madani, N., Blanchard, B., Maingourd, C., Alongi, A., Torina, A., Fernández de Mera, I. G., Vicente, J., George, J.-C., Vayssier-Taussat, M., Joncour, G. (2013). Prevalence of Tick-Borne Pathogens in Adult *Dermacentor* spp. Ticks from Nine Collection Sites in France. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 13(4): 226-236.
- Bremer, W. G., Schaefer, J. J., Wagner, E. R., Ewing, S. A., Rikihisa, Y., Needham, G. R., Jittapalpong, S., Moore, D. L., Stich, R. W. (2005). Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet Parasitol.* 131(1-2): 95-105.
- Brouqui, P., Sanogo, Y. O., Caruso, G., Merola, F., Raoult, D. (2003). *Candidatus Ehrlichia walkerii*: a new *Ehrlichia* detected in *Ixodes ricinus* tick collected from asymptomatic humans in Northern Italy. *Ann N Y Acad Sci.* 990: 134-140.
- Brunner, J. L., Ostfeld, R. S. (2008). Multiple causes of variable tick burdens on small-mammal hosts. *Ecology.* 89(8): 2259-2272.
- Buczek, A., Bartosik, K., Zając, Z. (2014). Changes in the activity of adult stages of *Dermacentor reticulatus* (Ixodida: Amblyommidae) induced by weather factors in eastern Poland. *Parasit Vectors.* 7(1): 245.
- Buczek, A., Bartosik, K. A., Wiśniowski, L., Tomaszewicz, K. (2013). Changes in population abundance of adult *Dermacentor reticulatus* (Acari: Amblyommidae) in long-term investigations in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med.* 20(2): 269-272.
- Buczek, A., Zając, Z., Woźniak, A., Kulina, D., Bartosik, K. (2017). Locomotor activity of adult *Dermacentor reticulatus* ticks (Ixodida: Ixodidae) in natural conditions. *Ann Agric Environ Med.* 24(2): 271-275.
- Bullová, E., Lukáš, M., Stanko, M., Peňko, B. (2009). Spatial distribution of *Dermacentor reticulatus* tick in Slovakia in the beginning of the 21st century. *Vet Parasitol.* 165(3-4): 357-360.
- Burks, C. S., Steward Jr., R. L., Needham, G. R., Lee Jr., R. E. (1996a). Cold hardiness in the Ixodid ticks (Ixodidae). In: *Acarology IX*, Vol. 1, Proceedings (ed. by R. Mitchell, D. J. Horn, G. R. Needham, W. C. Welbourn). Ohio Biological Survey, Columbus, OH, USA. S. 85-87.
- Burks, C. S., Stewart Jr., J. R., Needham, G. R., Lee Jr., R. E. (1996b). The role of direct chilling injury and inoculative freezing in cold tolerance of *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis* and *Ixodes scapularis*. *Physiol Entomol.* 21(1): 44-50.
- Burri, C., Schumann, O., Schumann, C., Gern, L. (2014). Are *Apodemus* spp. mice and *Myodes glareolus* reservoirs for *Borrelia miyamotoi*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, *Rickettsia helvetica*, *R. monacensis* and *Anaplasma phagocytophilum*? *Ticks Tick Borne Dis.* 5(3): 245-251.
- Cabezas-Cruz, A., Zwegarth, E., Vancová, M., Broniszewska, M., Grubhoffer, L., Passos, L. M., Ribeiro, M. F., Alberdi, P., de la Fuente, J. (2016). *Ehrlichia minasensis* sp. nov., a new species within the genus *Ehrlichia* isolated from the tick *Rhipicephalus microplus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 66: 1426-1430.
- Campbell, N. A., Reece, J. B. (2003). *Biologie*. 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, ISBN: 3-8274-1352-4. S. 94.
- Carrade, D. D., Foley, J. E., Borjesson, D. L., Sykes, J. E. (2009). Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *J Vet Intern Med.* 23(6): 1129-1141.
- Carreño, A. D., Alleman, A. R., Barbet, A. F., Palmer, G. H., Noh, S. M., Johnson, C. M. (2007). *In vivo* endothelial cell infection by *Anaplasma marginale*. *Vet Pathol.* 44(1): 116-118.

- Casjens, S. R., Eggers, H., Schwartz, I. (2010). *Borrelia* Genomics: Chromosome, Plasmids, Bacteriophages and Genetic Variation. In: *Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis*. Radolf, J. D. und Samuels, D. S., Hrsg., Great Britain, Caister Academic Press. ISBN 9781904455585. S. 27.
- Cassini, R., Zanutto, S., Frangipane di Regalbono, A., Gabrielli, S., Calderini, P., Moretti, A., Tampieri, M. P., Pietrobelli, M. (2009). Canine piroplasmiasis in Italy: epidemiological aspects in vertebrate and invertebrate hosts. *Vet Parasitol.* 165(1-2): 30-35.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention (2016). Symptoms, Diagnosis and Treatment of Anaplasmosis. abgerufen am: 24.07.2017, 11.45 Uhr, von <https://www.cdc.gov/anaplasmosis/>.
- Chitimia-Dobler, L. (2015). Spatial distribution of *Dermacentor reticulatus* in Romania. *Vet Parasitol.* 214(1-2): 219-223.
- Chmielewski, T., Podsiadly, E., Karbowski, G., Tylewska-Wierzbanowska, S. (2009). *Rickettsia* spp. in ticks, Poland. *Emerg Infect Dis.* 15(3): 486-488.
- Chrudimská, T., Čeřovský, V., Slaninová, J., Rego, R. O., Grubhoffer, L. (2014). Defensin from the ornate sheep tick *Dermacentor marginatus* and its effect on Lyme borreliosis spirochetes. *Dev Comp Immunol.* 46(2): 165-170.
- Claerebout, E., Losson, B., Cochez, C., Casaert, S., Dalemans, A.-C., De Cat, A., Madder, M., Saegerman, C., Heyman, P., Lempereur, L. (2013). Ticks and associated pathogens collected from dogs and cats in Belgium. *Parasit Vectors.* 6: 183.
- Cochez, C., Lempereur, L., Madder, M., Claerebout, E., Simons, L., de Wilde, N., Linden, A., Saegerman, C., Heyman, P., Losson, B. (2012). Foci report on indigenous *Dermacentor reticulatus* populations in Belgium and a preliminary study of associated babesiosis pathogens. *Med Vet Entomol.* 26(3): 355-358.
- Crippa, M., Rais, O., Gern, L. (2002). Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2(1): 3-9.
- Cutler, S. J., Rudenko, N., Golovchenko, M., Cramaro, W. J., Kirpach, J., Savic, S., Christova, I., Amaro, A. (2017). Diagnosing Borreliosis. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 17(1): 2-11.
- Dantas-Torres, F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors.* 3: 26.
- Dantas-Torres, F., Lia, R. P., Capelli, G., Otranto, D. (2013). Efficiency of flagging and dragging for tick collection. *Exp Appl Acarol.* 61(1): 119-127.
- Dautel, H. (2010). Zecken und Temperatur. In: *Denisia 30 – Krank durch Arthropoden*. Aspöck, H., Hrsg., Linz, Biologiezentrum der Oberösterreichischen Landesmuseen. S. 149-169.
- Dautel, H., Dippel, C., Kämmer, D., Werkhausen, A., Kahl, O. (2008). Winter activity of *Ixodes ricinus* in a Berlin forest. *Int J Med Microbiol.* 298 Suppl 1: 50–54.
- Dautel, H., Dippel, C., Oehme, R., Hartelt, K., Schettler, E. (2006). Evidence for an increased geographical distribution of *Dermacentor reticulatus* in Germany and detection of *Rickettsia* sp. RpA4. *Int J Med Microbiol.* 296 Suppl 40: 149-156.
- Dautel, H., Knülle, W. (1996). The supercooling ability of ticks (Acari, Ixodoidea). *J Comp Physiol B.* 166(8): 517-524.
- de la Fuente, J., Kocan, K. M., Blouin, E. F., Zivkovic, Z., Naranjo, V., Almazán, C., Esteves, E., Jongejan, F., Daffre, S., Mangold, A. J. (2010). Functional genomics and evolution of tick-*Anaplasma* interactions and vaccine development. *Vet Parasitol.* 167(2-4): 175-186.
- de Marco, M., Hernández-Triana, L. M., Phipps, L. P., Hansford, K., Mitchell, E. S., Cull, B., Swainsbury, C. S., Fooks, A. R., Medlock, J. M., Johnson, N. (2017). Emergence of *Babesia canis* in southern England. *Parasit Vectors.* 10(1): 241.
- de Waal, D. T. (1992). Equine piroplasmiasis: a review. *Br Vet J.* 148(1): 6-14.
- Deplazes, P., Eckert, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Zahner, H. (2013a). Stamm Alveolata, Ordnung Piroplasmida, In: *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. Stuttgart, Enke Verlag. ISBN: 978-3-8304-1135-2. S. 114-30.
- Deplazes, P., Eckert, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Zahner, H. (2013b). Stamm Arthropoda (Gliederfüßer), In: *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. Stuttgart, Enke Verlag. ISBN: 978-3-8304-1135-2. S. 372-91.

- des Vignes, F., Piesman, J., Heffernan, R., Schulze, T. L., Stafford, K. C., Fish, D. (2001). Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J Infect Dis.* 183(5): 773-778.
- Didyk, Y. M., Blaňárová, L., Pogrebnyak, S., Akimov, I., Peťko, B., Víchová, B. (2017). Emergence of tick-borne pathogens (*Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia raoultii* and *Babesia microti*) in the Kyiv urban parks, Ukraine. *Ticks Tick Borne Dis.* 8(2): 219-225.
- Diniz, P. P., Schulz, B. S., Hartmann, K., Breitschwerdt, E. B. (2011). "Candidatus Neoehrlichia mikurensis" infection in a dog from Germany. *J Clin Microbiol.* 49(5): 2059-2062.
- Dobec, M., Golubic, D., Punda-Polic, V., Kaeppli, F., Sievers, M. (2009). *Rickettsia helvetica* in *Dermacentor reticulatus* ticks. *Emerg Infect Dis.* 15(1): 98-100.
- Dolan, M. C., Maupin, G. O., Panella, N. A., Golde, W. T., Piesman, J. (1997). Vector competence of *Ixodes scapularis*, *I. spinipalpis*, and *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) in transmitting *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme disease. *J Med Entomol.* 34(2): 128-135.
- Dörr, B., Gothe, R. (2001). Cold-hardiness of *Dermacentor marginatus* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol.* 25(2): 151-169.
- Drózd, J., Bogdaszewska, Z. (1997). A focus of *Dermacentor reticulatus* kept by red and fallow deer in animal husbandry (Kosewo, Poland). *Wiad Parazytol.* 43(2): 207-212.
- Dugat, T., Lagrée, A. C., Maillard, R., Boulouis, H.-J., Haddad, N. (2015). Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. *Front Cell Infect Microbiol.* 5: 61.
- Duh, D., Slovák, M., Saksida, A., Strašek, K., Petrovec, M., Avšič-Županc, T. (2006). Molecular detection of *Babesia canis* in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in Slovakia. *Biologia (Bratisl).* 61(2): 231-233.
- Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F. R. (2001). Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51(6): 2145-2165.
- Duscher, G. G., Feiler, A., Leschnik, M., Joachim, A. (2013). Seasonal and spatial distribution of ixodid tick species feeding on naturally infested dogs from Eastern Austria and the influence of acaricides/repellents on these parameters. *Parasit Vectors.* 6(1): 76.
- Duscher, G. G., Hodžić, A., Weiler, M., Vaux, A. G., Rudolf, I., Sixl, W., Medlock, J. M., Versteirt, V., Hubálek, Z. (2016). First report of *Rickettsia raoultii* in field collected *Dermacentor reticulatus* ticks from Austria. *Ticks Tick Borne Dis.* 7(5): 720-722.
- Dzięgiel, B., Adaszek, L., Carbonero, A., Łyp, P., Winiarczyk, M., Dębiak, P., Winiarczyk, S. (2016). Detection of canine vector-borne diseases in eastern Poland by ELISA and PCR. *Parasitol Res.* 115(3): 1039-1044.
- Eddlestone, S. M., Diniz, P. P. V. P., Neer, T. M., Gaunt, S. D., Corstvet, R., Cho, D., Hosgood, G., Hegarty, B., Breitschwerdt, E. B. (2007). Doxycycline clearance of experimentally induced chronic *Ehrlichia canis* infection in dogs. *J Vet Intern Med.* 21(6): 1237-1242.
- Eichenberger, R. M., Deplazes, P., Mathis, A. (2015). Ticks on dogs and cats: a pet owner-based survey in a rural town in northeastern Switzerland. *Ticks Tick Borne Dis.* 6(3): 267-271.
- Eichler, W. (1959). Die Zeckengattungen *Dermacentor* und *Hyalomma* auf dem Gebiete der Deutschen Demokratischen Republik. *Dtsch Gesundheitsw.* 14: 1172.
- Elfving, K., Malmsten, J., Dalin, A.-M., Nilsson, K. (2015). Serologic and Molecular Prevalence of *Rickettsia helvetica* and *Anaplasma phagocytophilum* in Wild Cervids and Domestic Mammals in the Central Parts of Sweden. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 15(9): 529-534.

- Estrada-Peña, A., Farkas, R., Jaenson, T. G., Koenen, F., Madder, M., Pascucci, I., Salman, M., Tarrés-Call, J., Jongejan, F. (2013a). Association of environmental traits with the geographic ranges of ticks (Acari: Ixodidae) of medical and veterinary importance in the western Palearctic. A digital data set. *Exp Appl Acarol.* 59(3): 351-366.
- Estrada-Peña, A., Gray, J. S., Kahl, O., Lane, R. S., Nijhof, A. M. (2013b). Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens - methodological principles and caveats. *Front Cell Infect Microbiol.* 3: 29.
- Farkas, R., Takács, N., Hornyák, A., Nachum-Biala, Y., Hornok, S., Baneth, G. (2015). First report on *Babesia* cf. *microti* infection of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Hungary. *Parasit Vectors.* 8(1): 55.
- Fehr, J. S., Bloemberg, G. V., Ritter, C., Hombach, M., Lüscher, T. F., Weber, R., Keller, P. M. (2010). Septicemia caused by tick-borne bacterial pathogen *Candidatus Neohhrlichia mikurensis*. *Emerg Infect Dis.* 16(7): 1127-1129.
- Fernández-Soto, P., Pérez-Sánchez, R., Encinas-Grandes, A., Alamo Sanz, R. (2006). *Rickettsia slovacica* in *Dermacentor* ticks found on humans in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 25(2): 129-131.
- Fingerle, V., Goodman, J. L., Johnson, R. C., Kurtti, T. J., Munderloh, U. G., Wilske, B. (1997). Human granulocytic ehrlichiosis in southern Germany: increased seroprevalence in high-risk groups. *J Clin Microbiol.* 35(12): 3244-3247.
- Fitzi-Rathgen, J. (2016). Auf den Hund gekommen: Illegaler Hundehandel und -import fördern Tierleid und Kriminalität. In: Schweizer Tierschutz STS. Basel. 28 Seiten.
- Földvári, G., Farkas, R. (2005). Ixodid tick species attaching to dogs in Hungary. *Vet Parasitol.* 129(1-2): 125-131.
- Földvári, G., Márialigeti, M., Solymosi, N., Lukács, Z., Majoros, G., Kósa, J. P., Farkas, R. (2007). Hard ticks infesting dogs in Hungary and their infection with *Babesia* and *Borrelia* species. *Parasitol Res.* 101(1): 25-34.
- Földvári, G., Rigó, K., Lakos, A. (2013). Transmission of *Rickettsia slovacica* and *Rickettsia raoultii* by male *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks to humans. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 76(3): 387-389.
- Földvári, G., Široký, P., Szekeres, S., Majoros, G., Sprong, H. (2016). *Dermacentor reticulatus*: a vector on the rise. *Parasit Vectors.* 9(1): 314.
- Fourie, J. J., Stanneck, D., Luus, H. G., Beugnet, F., Wijnveld, M., Jongejan, F. (2013). Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. *Vet Parasitol.* 197(3-4): 595-603.
- Fourie, L. J., van der Lingen, F., Kok, D. J. (1995). Improvement of field sampling methods for adult Karoo paralysis ticks, *Ixodes rubicundus* (Acari: Ixodidae), through addition of host odour. *Exp Appl Acarol.* 19(2): 93-101.
- Fournier, P.-E., Allombert, C., Supputamongkol, Y., Caruso, G., Brouqui, P., Raoult, D. (2004). Aneruptive fever associated with antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand. *J Clin Microbiol.* 42(2): 816-818.
- García-Sanmartín, J., Barandika, J. F., Juste, R. A., García-Pérez, A. L., Hurtado, A. (2008). Distribution and molecular detection of *Theileria* and *Babesia* in questing ticks from northern Spain. *Med Vet Entomol.* 22(4): 318-325.
- Georges, K. C., Ezeokoli, C. D., Sparagano, O., Pargass, I., Campbell, M., D'Abadie, R., Yabsley, M. J. (2011). A case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. *Vet Parasitol.* 175(3-4): 363-366.
- Gern, L. (2008). *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the agent of lyme borreliosis: life in the wilds. *Parasite.* 15(3): 244-247.
- Gherman, C. M., Mihalca, A. D., Dumitrache, M. O., Györke, A., Oroian, I., Sandor, M., Cozma, V. (2012). CO₂ flagging - an improved method for the collection of questing ticks. *Parasit Vectors.* 5: 125.
- Ginsberg, H. S., Ewing, C. P. (1989). Comparison of flagging, walking, trapping, and collecting from hosts as sampling methods for northern deer ticks, *Ixodes dammini*, and lone-star ticks, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol.* 7(4): 313-322.

- Gothe, R., Wegerdt, S. (1991). Babesiosis of dogs in Germany: epidemiologic case analysis. *Tierärztliche Praxis*. 19(2): 170-173.
- Grankvist, A., Andersson, P. O., Mattsson, M., Sender, M., Vaht, K., Höper, L., Sakiniene, E., Trysberg, E., Stenson, M., Fehr, J., Pekova, S., Bogdan, C., Bloemberg, G., Wennerås, C. (2014). Infections with the tick-borne bacterium "*Candidatus Neohrlichia mikurensis*" mimic noninfectious conditions in patients with B cell malignancies or autoimmune diseases. *Clin Infect Dis*. 58(12): 1716-1722.
- Gray, J., Dantas-Torres, F., Estrada-Peña, A., Levin, M. (2013). Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks Tick Borne Dis*. 4(3): 171-180.
- Gray, J. S. (1985). A carbon dioxide trap for prolonged sampling of *Ixodes ricinus* L. populations. *Exp Appl Acarol*. 1(1): 35-44.
- Groves, M. G., Dennis, G. L., Amyx, H. L., Huxsoll, D. L. (1975). Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am J Vet Res*. 36(7): 937-940.
- Grzeszczuk, A., Stanczak, J. (2006). High prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in ticks removed from human skin in north-eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*. 13(1): 45-48.
- Guillemi, E. C., Tomassone, L., Farber, M. D. (2015). Tick-borne Rickettsiales: Molecular tools for the study of an emergent group of pathogens. *J Microbiol Methods*. 119: 87-97.
- Halos, L., Lebert, I., Abrial, D., Danlois, F., Garzik, K., Rodes, D., Schillmeier, M., Ducrot, C., Guillot, J. (2014). Questionnaire-based survey on the distribution and incidence of canine babesiosis in countries of Western Europe. *Parasite*. 21: 13.
- Hamel, D., Röhrig, E., Pfister, K. (2011). Canine vector-borne disease in travelled dogs in Germany - A retrospective evaluation of laboratory data from the years 2004–2008. *Vet Parasitol*. 181(1): 31-36.
- Hamel, D., Silaghi, C., Zapadynska, S., Kudrin, A., Pfister, K. (2013). Vector-borne pathogens in ticks and EDTA-blood samples collected from client-owned dogs, Kiev, Ukraine. *Ticks Tick Borne Dis*. 4(1-2): 152-155.
- Harrus, S., Alleman, A. R., Bark, H., Mahan, S. M., Waner, T. (2002). Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Vet Microbiol*. 86(4): 361-368.
- Harrus, S., Kenny, M., Miara, L., Aizenberg, I., Waner, T., Shaw, S. (2004). Comparison of Simultaneous Splenic Sample PCR with Blood Sample PCR for Diagnosis and Treatment of Experimental *Ehrlichia canis* Infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 48(11): 4488–4490.
- Harrus, S., Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet J*. 187(3): 292-296.
- Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., Bark, H. (1998). Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. *J Clin Microbiol*. 36(7): 2140-2142.
- Harrus, S., Waner, T., Bark, H., Jongejan, F., Cornelissen, A. W. (1999). Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol*. 37(9): 2745-2749.
- Hedderich, J., Sachs, L. (2015). *Angewandte Statistik: Methodensammlung mit R*. Springer Berlin Heidelberg. ISBN 9783662456910. S. 804.
- Heile, C., Heydorn, A. O., Schein, E. (2006). *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) - distribution, biology and vector for *Babesia canis* in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 119(7-8): 330-334.
- Heile, C., Hoffmann-Köhler, P., Wiemann, A., Schein, E. (2007). Übertragungszeiten von durch Zecken übertragenen Erregern beim Hund: Borrelien, Anaplasmen/Ehrlichien und Babesien. *Prakt Tierarzt*. 88(8): 584-590.
- Henniger, T., Henniger, P., Grossmann, T., Distl, O., Ganter, M., von Loewenich, F. D. (2013). Congenital infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a calf in northern Germany. *Acta Vet Scand*. 55(1): 38.

- Herron, M. J., Ericson, M. E., Kurtti, T. J., Munderloh, U. G. (2005). The interactions of *Anaplasma phagocytophilum*, endothelial cells, and human neutrophils. *Ann N Y Acad Sci.* 1063(1): 374-382.
- Hildebrandt, A., Hunfeld, K.-P., Baier, M., Krumbholz, A., Sachse, S., Lorenzen, T., Kiehnopf, M., Fricke, H.-J., Straube, E. (2007). First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 26(8): 595-601.
- Hodžić, A., Fuehrer, H. P., Duscher, G. G. (2016). First Molecular Evidence of Zoonotic Bacteria in Ticks in Bosnia and Herzegovina. *Transbound Emerg Dis.* 64(4): 1313-1316.
- Hodžić, A., Zörer, J., Duscher, G. G. (2017). *Dermacentor reticulatus*, a putative vector of *Babesia cf. microti* (syn. *Theileria annae*) piroplasm. *Parasitol Res.* 116(3): 1075-1077.
- Hofmann-Lehmann, R., Wagmann, N., Meli, M. L., Riond, B., Novacco, M., Joekel, D., Gentilini, F., Marsilio, F., Pennisi, M. G., Lloret, A., Carrapiço, T., Boretti, F. S. (2016). Detection of 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' and other *Anaplasmataceae* and *Rickettsiaceae* in Canidae in Switzerland and Mediterranean countries. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 158(10): 691-700.
- Hofmeester, T. R., van der Lei, P. B., Docters van Leeuwen, A., Sprong, H., van Wieren, S. E. (2016). New foci of *Haemaphysalis punctata* and *Dermacentor reticulatus* in the Netherlands. *Ticks Tick Borne Dis.* 7(2): 367-370.
- Hornok, S. (2009). Allochronic seasonal peak activities of *Dermacentor* and *Haemaphysalis* spp. under continental climate in Hungary. *Vet Parasitol.* 163(4): 366-369.
- Hornok, S., Farkas, R. (2009). Influence of biotope on the distribution and peak activity of questing ixodid ticks in Hungary. *Med Vet Entomol.* 23(1): 41-46.
- Hornok, S., Kartali, K., Takács, N., Hofmann-Lehmann, R. (2016). Uneven seasonal distribution of *Babesia canis* and its two 18S rDNA genotypes in questing *Dermacentor reticulatus* ticks in urban habitats. *Ticks Tick Borne Dis.* 7(5): 694-697.
- Hornok, S., Meli, M. L., Gönczi, E., Halász, E., Takács, N., Farkas, R., Hofmann-Lehmann, R. (2014). Occurrence of ticks and prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* s.l. in three types of urban biotopes: forests, parks and cemeteries. *Ticks Tick Borne Dis.* 5(6): 785-789.
- Hornok, S., Meli, M. L., Gönczi, E., Hofmann-Lehmann, R. (2017). Seasonally biased or single-habitat sampling is not informative on the real prevalence of *Dermacentor reticulatus*-borne rickettsiae - A pilot study. *Acta Vet Hung.* 65(1): 81-88.
- Hornok, S., Micsutka, A., Fernández de Mera, I. G., Meli, M. L., Gönczi, E., Tánzos, B., Mangold, A. J., Farkas, R., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., de la Fuente, J. (2012). Fatal bovine anaplasmosis in a herd with new genotypes of *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis* and concurrent haemoplasmosis. *Res Vet Sci.* 92(1): 30-35.
- Hubálek, Z., Halouzka, J., Juricová, Z. (1998). Investigation of haematophagous arthropods for borreliae - summarized data, 1988-1996. *Folia Parasitol (Praha).* 45(1): 67-72.
- Hubálek, Z., Halouzka, J., Juricová, Z. (2003a). Host-seeking activity of ixodid ticks in relation to weather variables. *J Vector Ecol.* 28(2): 159-165.
- Hubálek, Z., Stünzner, D., Halouzka, J., Sixl, W., Wendelin, I., Juricová, Z., Sanogo, Y. O. (2003b). Prevalence of borreliae in ixodid ticks from a floodplain forest ecosystem. *Wien Klin Wochenschr.* 115(3-4): 121-124.
- Hubbard, M. J., Baker, A. S., Cann, K. J. (1998). Distribution of *Borrelia burgdorferi* s.l. spirochaete DNA in British ticks (Argasidae and Ixodidae) since the 19th century, assessed by PCR. *Med Vet Entomol.* 12(1): 89-97.
- Hunfeld, K.-P., Brade, V. (1999). Prevalence of antibodies against the human granulocytic ehrlichiosis agent in Lyme borreliosis patients from Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 18(3): 221-224.
- Immler, R. M. (1973). Untersuchungen zur Biologie und Ökologie der Zecke *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) (Ixodidae) in einem endemischen Vorkommensgebiet. *Mitteilung der schweizerischen entomologischen Gesellschaft.* 46(1-2): 1-70.
- Inokuma, H., Maetani, S., Fujitsuka, J., Takano, A., Sato, K., Fukui, T., Masuzawa, T., Kawabata, H. (2013). Astasia and pyrexia related to *Borrelia garinii* infection in two dogs in Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci.* 75(7): 975-978.

- Inokuma, H., Seino, N., Suzuki, M., Kaji, K., Takahashi, H., Igota, H., Inoue, S. (2008). Detection of *Rickettsia helvetica* DNA from peripheral blood of Sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Japan. *J Wildl Dis.* 44(1): 164-167.
- Ionita, M., Silaghi, C., Mitrea, I. L., Edouard, S., Parola, P., Pfister, K. (2016). Molecular detection of *Rickettsia conorii* and other zoonotic spotted fever group rickettsiae in ticks, Romania. *Ticks Tick Borne Dis.* 7(1): 150-153.
- Jahfari, S., Coipan, E. C., Fonville, M., van Leeuwen, A. D., Hengeveld, P., Heylen, D., Heyman, P., van Maanen, C., Butler, C. M., Földvári, G., Szekeres, S., van Duijvendijk, G., Tack, W., Rijks, J. M., van der Giessen, J., Takken, W., van Wieren, S. E., Takumi, K., Sprong, H. (2014). Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. *Parasit Vectors.* 7(1): 365.
- Jahfari, S., Fonville, M., Hengeveld, P., Reusken, C., Scholte, E.-J., Takken, W., Heyman, P., Medlock, J., Heylen, D., Kleve, J., Sprong, H. (2012). Prevalence of *Neoehrlichia mikurensis* in ticks and rodents from North-west Europe. *Parasit Vectors.* 5(1): 74.
- Jensen, J., Simon, D., Escobar, H. M., Soller, J. T., Bullerdiek, J., Beelitz, P., Pfister, K., Nolte, I. (2007). *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Zoonoses Public Health.* 54(2): 94-101.
- Johns, R., Ohnishi, J., Broadwater, A., Sonenshine, D. E., de Silva, A. M., Hynes, W. L. (2001). Contrasts in tick innate immune responses to *Borrelia burgdorferi* challenge: immunotolerance in *Ixodes scapularis* versus immunocompetence in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol.* 38(1): 99-107.
- Johnson, E. M., Ewing, S. A., Barker, R. W., Fox, J. C., Crow, D. W., Kocan, K. M. (1998). Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol.* 74(2-4): 277-288.
- Jongejan, F., Ringenier, M., Putting, M., Berger, L., Burgers, S., Kortekaas, R., Lenssen, J., van Roessel, M., Wijnveld, M., Madder, M. (2015). Novel foci of *Dermacentor reticulatus* ticks infected with *Babesia canis* and *Babesia caballi* in the Netherlands and in Belgium. *Parasit Vectors.* 8(1): 232.
- Kahl, O., Janetzki-Mittmann, C., Gray, J. S., Jonas, R., Stein, J., de Boer, R. (1998). Risk of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato for a host in relation to the duration of nymphal *Ixodes ricinus* feeding and the method of tick removal. *Zentralbl Bakteriol.* 287(1-2): 41-52.
- Kahl, O., Janetzki, C., Gray, J. S., Stein, J., Bauch, R. J. (1992). Tick infection rates with *Borrelia: Ixodes ricinus* versus *Haemaphysalis concinna* and *Dermacentor reticulatus* in two locations in eastern Germany. *Med Vet Entomol.* 6(4): 363-366.
- Karbowiak, G. (2014). The occurrence of the *Dermacentor reticulatus* tick - its expansion to new areas and possible causes. *Ann Parasitol.* 60(1): 37-47.
- Karbowiak, G., Biernat, B., Stańczak, J., Szewczyk, T., Werszko, J. (2016a). The role of particular tick developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens affecting humans in Central Europe. 3. Rickettsiae. *Ann Parasitol.* 62(2): 89-100.
- Karbowiak, G., Slivinska, K., Chmielewski, T., Barszcz, K., Tylewska-Wierzbanowska, S., Werszko, J., Szewczyk, T., Wróblewski, P. (2016b). *Rickettsia raoultii* in *Dermacentor reticulatus* Ticks, Chernobyl Exclusion Zone, Ukraine, 2010. *Emerg Infect Dis.* 22(12): 2214-2215.
- Karbowiak, G., Vichová, B., Slivinska, K., Werszko, J., Didyk, J., Pet'ko, B., Stanko, M., Akimov, I. (2014). The infection of questing *Dermacentor reticulatus* ticks with *Babesia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in the Chernobyl exclusion zone. *Vet Parasitol.* 204(3-4): 372-375.
- Karger, A., Kampen, H., Bettin, B., Dautel, H., Ziller, M., Hoffmann, B., Süß, J., Klaus, C. (2012). Species determination and characterization of developmental stages of ticks by whole-animal matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Ticks Tick Borne Dis.* 3(2): 78-89.
- Karlsson, U., Bjöersdorff, A., Massung, R. F., Christensson, B. (2001). Human granulocytic ehrlichiosis - a clinical case in Scandinavia. *Scand J Infect Dis.* 33(1): 73-74.

- Katavolos, P., Armstrong, P. M., Dawson, J. E., Telford, S. R., 3rd (1998). Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis.* 177(5): 1422-1425.
- Kawahara, M., Rikihisa, Y., Isogai, E., Takahashi, M., Misumi, H., Suto, C., Shibata, S., Zhang, C., Tsuji, M. (2004). Ultrastructure and phylogenetic analysis of '*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*' in the family *Anaplasmataceae*, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54(Pt 5): 1837-1843.
- Kieser, S. T., Eriks, I. S., Palmer, G. H. (1990). Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect Immun.* 58(4): 1117-1119.
- Kiewra, D., Czulowska, A., Lonc, E. (2016). Winter activity of *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) in the newly emerging population of Lower Silesia, south-west Poland. *Ticks Tick Borne Dis.* 7(6): 1124-1127.
- Kiewra, D., Kryza, M., Szymanowski, M. (2014). Influence of selected meteorological variables on the questing activity of *Ixodes ricinus* ticks in Lower Silesia, SW Poland. *J Vector Ecol.* 39(1): 138-145.
- Kinzer, D. R., Presley, S. M., Hair, J. A. (1990). Comparative efficiency of flagging and carbon dioxide-baited sticky traps for collecting the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acarina: Ixodidae). *J Med Entomol.* 27(5): 750-755.
- Kiss, T., Cadar, D., Krupaci, A. F., Bordeanu, A., Brudașcă, G. F., Mihalca, A. D., Mircean, V., Gliga, L., Dumitrache, M. O., Spînu, M. (2011). Serological reactivity to *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs and horses from distinct areas in Romania. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11(9): 1259-1262.
- Kiszewski, A. E., Matuschka, F. R., Spielman, A. (2001). Mating strategies and spermiogenesis in ixodid ticks. *Annu Rev Entomol.* 46: 167-182.
- Kloch, A., Mierzejewska, E. J., Karbowski, G., Slivinska, K., Alsarraf, M., Rodo, A., Kowalec, M., Dwuznik, D., Didyk, Y. M., Bajer, A. (2017). Origins of recently emerged foci of the tick *Dermacentor reticulatus* in central Europe inferred from molecular markers. *Vet Parasitol.* 237: 63-69.
- Knülle, W., Rudolph, D. (1982). Humidity Relationships and Water Balance of Ticks. In: *Physiology of Ticks.* Obenchain, F. D. und Galun, R., Hrsg., Pergamon Press. ISBN: 0-08-024937-X. S. 43-70.
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., Ewing, S. A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol.* 167(2-4): 95-107.
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Cabezas-Cruz, A. (2015). The genus *Anaplasma*: new challenges after reclassification. *Rev Sci Tech.* 34(2): 577-586.
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Guglielmone, A. A., Meléndez, R. D. (2003). Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin Microbiol Rev.* 16(4): 698-712.
- Kohn, B., Galke, D., Beelitz, P., Pfister, K. (2008). Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *J Vet Intern Med.* 22(6): 1289-1295.
- Kohn, B., Silaghi, C., Galke, D., Arndt, G., Pfister, K. (2011). Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Res Vet Sci.* 91(1): 71-76.
- Kováčová, E., Sekeyová, Z., Trávnicek, M., Bhide, M. R., Mardzinová, S., Curlik, J., Spanelová, D. (2006). Monitoring of humans and animals for the presence of various Rickettsiae and *Coxiella burnetii* by serological methods. *Ann N Y Acad Sci.* 1078(1): 587-589.
- Kowalski, J., Hopfenmüller, W., Fingerle, V., Malberg, H., Eisenblätter, M., Wagner, J., Miksits, K., Hahn, H., Ignatius, R. (2006). Seroprevalence of human granulocytic anaplasmosis in Berlin/Brandenburg, Germany: an 8-year survey. *Clin Microbiol Infect.* 12(9): 924-927.
- Kramer, V. L., Carper, E. R., Beesley, C. (1993). Mark and recapture of adult *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) to determine the effect of repeated removal sampling on tick abundance. *J Med Entomol.* 30(6): 1071-1073.
- Krause, P. J., Fish, D., Narasimhan, S., Barbour, A. G. (2015). *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humans. *Clin Microbiol Infect.* 21(7): 631-639.

- Król, N., Kiewra, D., Lonc, E., Janaczyk, B., Chodorowska-Skubiszewska, A., Dziecioł, M., Gola, M., Gruszka, R., Jackowska-Szlachcic, E., Jagiełło, M., Kawski, S., Łukaszewski, Z., Mizgalski, P., Narajowska, T., Niedzielska, J., Noczyński, M., Rudkowska, M., Rzepka, D., Samulski, K., Senze, M., Sieczko, P., Silny, A., Staniewska, A., Stańczyk, J., Stańczyk, W., Stasiak, M., Włodarczyk, M., Zimniak, S. (2016a). *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) and *Babesia canis* (Piana et Galli-Valerio, 1895) as the parasites of companion animals (dogs and cats) in the Wrocław area, south-western Poland. *Ann Parasitol.* 62(2): 125-130.
- Król, N., Kiewra, D., Szymanowski, M., Lonc, E. (2015). The role of domestic dogs and cats in the zoonotic cycles of ticks and pathogens. Preliminary studies in the Wrocław Agglomeration (SW Poland). *Vet Parasitol.* 214(1-2): 208-212.
- Król, N., Obiegala, A., Pfeffer, M., Lonc, E., Kiewra, D. (2016b). Detection of selected pathogens in ticks collected from cats and dogs in the Wrocław Agglomeration, South-West Poland. *Parasit Vectors.* 9(1): 351.
- Krücken, J., Schreiber, C., Maaz, D., Kohn, M., Demeler, J., Beck, S., Schein, E., Olias, P., Richter, D., Matuschka, F. R., Pachnicke, S., Krieger, K., Kohn, B., von Samson-Himmelstjerna, G. (2013). A novel high-resolution melt PCR assay discriminates *Anaplasma phagocytophilum* and "*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis". *J Clin Microbiol.* 51(6): 1958-1961.
- Krücken, J., Weingart, C., Rüter, M.-T., Ramünke, S., von Samson-Himmelstjerna, G., Kohn, B. (2016). Canine Babesiose im Raum Berlin/Brandenburg. In: DVG kompaktVet - Kongress-Magazin für Fortbildungen in der Medizin, Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fachgruppe "Parasitologie und parasitäre Krankheiten", Berlin. Vol. 2: S. 2.
- Krupka, I., Pantchev, N., Lorentzen, L., Weise, M., Straubinger, R. K. (2007). Durch Zecken übertragbare bakterielle Infektionen bei Hunden: Seroprävalenzen von *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato und *Ehrlichia canis* in Deutschland. *Prakt Tierarzt.* 88(10): 776–788.
- Kubelová, M., Tkadlec, E., Bednář, M., Roubalová, E., Siroký, P. (2011). West-to-east differences of *Babesia canis canis* prevalence in *Dermacentor reticulatus* ticks in Slovakia. *Vet Parasitol.* 180(3-4): 191-196.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 33(7): 1870-1874.
- Lack, J. B., Reichard, M. V., Van Den Bussche, R. A. (2012). Phylogeny and evolution of the Piroplasmida as inferred from 18S rRNA sequences. *Int J Parasitol.* 42(4): 353-363.
- Lane, R. S., Anderson, J. R., Yaninek, J. S., Burgdorfer, W. (1985). Diurnal host seeking of adult Pacific Coast ticks, *Dermacentor occidentalis* (Acari: Ixodidae), in relation to vegetational type, meteorological factors, and rickettsial infection rates in California, USA. *J Med Entomol.* 22(5): 558-571.
- Lane, R. S., Brown, R. N., Piesman, J., Peavey, C. A. (1994). Vector competence of *Ixodes pacificus* and *Dermacentor occidentalis* (Acari: Ixodidae) for various isolates of Lyme disease spirochetes. *J Med Entomol.* 31(3): 417-424.
- Leiby, D. A. (2011). Transfusion-transmitted *Babesia* spp.: bull's-eye on *Babesia microti*. *Clin Microbiol Rev.* 24(1): 14-28.
- Lempereur, L., Beck, R., Fonseca, I., Marques, C., Duarte, A., Santos, M., Zúquete, S., Gomes, J., Walder, G., Domingos, A., Antunes, S., Baneth, G., Silaghi, C., Holman, P., Zintl, A. (2017). Guidelines for the Detection of *Babesia* and *Theileria* Parasites. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 17(1): 51-65.
- Leschnik, M., Kirtz, G., Tichy, A., Leidinger, E. (2008). Seasonal occurrence of canine babesiosis is influenced by local climate conditions. *Int J Med Microbiol.* 298 Suppl. 1: 243–248.
- Levin, M. L., Killmaster, L. F., Zemtsova, G. E. (2012). Domestic dogs (*Canis familiaris*) as reservoir hosts for *Rickettsia conorii*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12(1): 28-33.
- Li, H., Jiang, J. F., Liu, W., Zheng, Y. C., Huo, Q. B., Tang, K., Zuo, S. Y., Liu, K., Jiang, B. G., Yang, H., Cao, W. C. (2012). Human infection with *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis, China. *Emerg Infect Dis.* 18(10): 1636-1639.

- Li, X., Dunley, J. E. (1998). Optimal sampling and spatial distribution of *Ixodes pacificus*, *Dermacentor occidentalis* and *Dermacentor variabilis* ticks (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol.* 22(4): 233-248.
- Liebisch, A., Rahman, M. S. (1976). Prevalence of the ticks *Dermacentor marginatus* (Sulzer, 1776) and *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) and their importance as vectors of diseases in Germany (author's transl). *Tropenmed Parasitol.* 27(4): 393-404.
- Liebisch, G., Thiet, W., Liebisch, A. (2006). Canine monocytic ehrlichiosis (CME) and canine granulocytic ehrlichiosis (CGE), two emerging tickborne diseases in Germany. *Prakt Tierarzt.* 87(5): 342-353.
- Liesner, J. M., Krücken, J., Schaper, R., Pachnicke, S., Kohn, B., Müller, E., Schulze, C., von Samson-Himmelstjerna, G. (2016). Vector-borne pathogens in dogs and red foxes from the federal state of Brandenburg, Germany. *Vet Parasitol.* 224: 44-51.
- Little, S. E., Heise, S. R., Blagburn, B. L., Callister, S. M., Mead, P. S. (2010). Lyme borreliosis in dogs and humans in the USA. *Trends Parasitol.* 26(4): 213-218.
- Lledó, L., Gegúndez, M. I., Giménez-Pardo, C., Álamo, R., Fernández-Soto, P., Nuncio, M. S., Saz, J. V. (2014). A seventeen-year epidemiological surveillance study of *Borrelia burgdorferi* infections in two provinces of northern Spain. *Int J Environ Res Public Health.* 11(2): 1661-1672.
- Lotric-Furlan, S., Petrovec, M., Avsic-Zupanc, T., Strle, F. (2005). Concomitant tickborne encephalitis and human granulocytic ehrlichiosis. *Emerg Infect Dis.* 11(3): 485-488.
- Louviere, J. J., Hensher, D. A., Swait, J. D. (2000). *Stated Choice Methods: Analysis and Applications.* Cambridge University Press. S. 54.
- Margos, G., Marosevic, D., Cutler, S., Derdakova, M., Diuk-Wasser, M., Emler, S., Fish, D., Gray, J., Hunfeldt, K. P., Jaulhac, B., Kahl, O., Kovalev, S., Kraiczy, P., Lane, R. S., Lienhard, R., Lindgren, P. E., Ogden, N., Ornstein, K., Rupprecht, T., Schwartz, I., Sing, A., Straubinger, R. K., Strle, F., Voordouw, M., Rizzoli, A., Stevenson, B., Fingerle, V. (2017). There is inadequate evidence to support the division of the genus *Borrelia*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 67(4): 1081-1084.
- Margos, G., Vollmer, S. A., Ogden, N. H., Fish, D. (2011). Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect Genet Evol.* 11(7): 1545-1563.
- Marshall, A. G. (1981). *The Ecology of Ectoparasitic Insects.* Academic Press. ISBN 9780124740808.
- Martinod, S., Gilot, B. (1991). Epidemiology of canine babesiosis in relation to the activity of *Dermacentor reticulatus* in southern Jura (France). *Exp Appl Acarol.* 11(2-3): 215-222.
- Matijatko, V., Kiš, I., Torti, M., Brkljačić, M., Rafaj, R. B., Žvorc, Z., Mrljak, V. (2010). Systemic inflammatory response syndrome and multiple organ dysfunction syndrome in canine babesiosis. *Veterinarski Archiv.* 80(5): 611-626.
- Matijatko, V., Torti, M., Schetters, T. P. (2012). Canine babesiosis in Europe: how many diseases? *Trends Parasitol.* 28(3): 99-105.
- Matjila, T. P., Nijhof, A. M., Taoufik, A., Houwers, D., Teske, E., Penzhorn, B. L., de Lange, T., Jongejan, F. (2005). Autochthonous canine babesiosis in the Netherlands. *Vet Parasitol.* 131(1-2): 23-29.
- Mátlová, L., Halouzka, J., Juřiková, Z., Hubálek, Z. (1996). Comparative experimental infection of *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae) with *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Folia Parasitol (Praha).* 43: 159-160.
- Matsumoto, K., Ogawa, M., Brouqui, P., Raoult, D., Parola, P. (2005). Transmission of *Rickettsia massiliae* in the tick, *Rhipicephalus turanicus*. *Med Vet Entomol.* 19(3): 263-270.
- Matuschka, F. R., Heiler, M., Eiffert, H., Fischer, P., Lotter, H., Spielman, A. (1993). Diversionary role of hoofed game in the transmission of Lyme disease spirochetes. *Am J Trop Med Hyg.* 48(5): 693-699.
- Maurer, F. P., Keller, P. M., Beuret, C., Joha, C., Achermann, Y., Gubler, J., Bircher, D., Karrer, U., Fehr, J., Zimmerli, L., Bloembergen, G. V. (2013). Close geographic association of human neoehrlichiosis and tick populations carrying "*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*" in eastern Switzerland. *J Clin Microbiol.* 51(1): 169-176.

- Mays, S. E., Houston, A. E., Trout Fryxell, R. T. (2016). Comparison of novel and conventional methods of trapping ixodid ticks in the southeastern U.S.A. *Med Vet Entomol.* 30(2): 123-134.
- McBride, J. W., Yu, X., Brayton, K. (2010). Ehrlichiosis, rickettsiosis and anaplasmosis in the United States: current status and opportunities for new vaccines. Workshop: "Critical Needs and Gaps in Understanding Prevention, Amelioration, and Resolution of Lyme and Other Tick-Borne Diseases: The Short-Term and Long-Term Outcomes, 2010". Institute of Medicine Committee on Lyme Disease and Other Tick-Borne Diseases; Washington D.C., 11.-12.10.2010. 27 Seiten.
- McClure, J. C., Crothers, M. L., Schaefer, J. J., Stanley, P. D., Needham, G. R., Ewing, S. A., Stich, R. W. (2010). Efficacy of a doxycycline treatment regimen initiated during three different phases of experimental ehrlichiosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(12): 5012-5020.
- Mediannikov, O., Matsumoto, K., Samoylenko, I., Drancourt, M., Roux, V., Rydkina, E., Davoust, B., Tarasevich, I., Brouqui, P., Fournier, P. E. (2008). *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58(Pt 7): 1635-1639.
- Medlock, J. M., Hansford, K. M., Vaux, A. G. C., Cull, B., Abdullah, S., Pietzsch, M. E., Wall, R., Johnson, N., Phipps, L. P. (2017). Distribution of the tick *Dermacentor reticulatus* in the United Kingdom. *Med Vet Entomol.* 31(3): 281-288.
- Mehlhorn, H., Schein, E. (1998). Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. *Parasitol Res.* 84(6): 467-475.
- Mencke, N. (2013). Future challenges for parasitology: Vector control and 'One health' in Europe: The veterinary medicinal view on CVBDs such as tick borreliosis, rickettsiosis and canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 195(3-4): 256-271.
- Menn, B., Lorentz, S., Naucke, T. J. (2010). Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasit Vectors.* 3(1): 34.
- Merhej, V., Raoult, D. (2011). Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 86(2): 379-405.
- Meyer-König, A., Zahler, M., Gothe, R. (2001a). Studies on survival and water balance of unfed adult *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol.* 25(12): 993-1004.
- Meyer-König, A., Zahler, M., Gothe, R. (2001b). Studies on the critical water mass and the rehydration potential of unfed adult *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol.* 25(6): 505-516.
- Michelet, L., Joncour, G., Devillers, E., Torina, A., Vayssier-Taussat, M., Bonnet, S. I., Moutailler, S. (2016). Tick species, tick-borne pathogens and symbionts in an insular environment off the coast of Western France. *Ticks Tick Borne Dis.* 7(6): 1109-1115.
- Mierzejewska, E. J., Alsarraf, M., Behnke, J. M., Bajer, A. (2015a). The effect of changes in agricultural practices on the density of *Dermacentor reticulatus* ticks. *Vet Parasitol.* 211(3-4): 259-265.
- Mierzejewska, E. J., Estrada-Peña, A., Alsarraf, M., Kowalec, M., Bajer, A. (2016). Mapping of *Dermacentor reticulatus* expansion in Poland in 2012-2014. *Ticks Tick Borne Dis.* 7(1): 94-106.
- Mierzejewska, E. J., Estrada-Peña, A., Bajer, A. (2017). Spread of *Dermacentor reticulatus* is associated with the loss of forest area. *Exp Appl Acarol.* 72(4): 399-413.
- Mierzejewska, E. J., Pawełczyk, A., Radkowski, M., Welc-Falęciak, R., Bajer, A. (2015b). Pathogens vectored by the tick, *Dermacentor reticulatus*, in endemic regions and zones of expansion in Poland. *Parasit Vectors.* 8: 490.
- Mierzejewska, E. J., Welc-Falęciak, R., Bednarska, M., Rodo, A., Bajer, A. (2014). The first evidence for vertical transmission of *Babesia canis* in a litter of Central Asian Shepherd dogs. *Ann Agric Environ Med.* 21(3): 500-503.
- Mierzejewska, E. J., Welc-Falęciak, R., Karbowski, G., Kowalec, M., Behnke, J. M., Bajer, A. (2015c). Dominance of *Dermacentor reticulatus* over *Ixodes ricinus* (Ixodidae) on

- livestock, companion animals and wild ruminants in eastern and central Poland. *Exp Appl Acarol.* 66(1): 83-101.
- Mihaljica, D., Radulović, Ž., Tomanović, S., Ćakić, S., Penezić, A., Milutinović, M. (2012). Molecular detection of *Babesia* spp. in ticks in northern Serbia. *Arch Biol Sci.* 64(4): 1591-1598.
- Mircean, V., Dumitrache, M. O., Györke, A., Pantchev, N., Jodies, R., Mihalca, A. D., Cozma, V. (2012). Seroprevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections (*Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Ehrlichia canis*) in dogs from Romania. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12(7): 595-604.
- Moniuszko-Malinowska, A., Swiecicka, I., Dunaj, J., Zajkowska, J., Czupryna, P., Zambrowski, G., Chmielewska-Badora, J., Żukiewicz-Sobczak, W., Swierzbinska, R., Rutkowski, K., Garkowski, A., Pancewicz, S. (2016). Infection with *Babesia microti* in humans with non-specific symptoms in North East Poland. *Infect Dis (Lond).* 48(7): 537-543.
- Moniuszko, A., Dunaj, J., Czupryna, P., Zajkowska, J., Pancewicz, S. (2015). Neoehrlichiosis - a new tick-borne disease - is there a threat in Poland? *Przegl Epidemiol.* 69(1): 23-26, 131-133.
- Murray, G. G., Weinert, L. A., Rhule, E. L., Welch, J. J. (2016). The Phylogeny of *Rickettsia* Using Different Evolutionary Signatures: How Tree-Like is Bacterial Evolution? *Syst Biol.* 65(2): 265-279.
- Mylonakis, M. E., Koutinas, A. F., Billinis, C., Leontides, L. S., Kontos, V., Papadopoulos, O., Rallis, T., Fytianou, A. (2003). Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Vet Microbiol.* 91(2-3): 197-204.
- Najm, N. A., Meyer-Kayser, E., Hoffmann, L., Herb, I., Fensterer, V., Pfister, K., Silaghi, C. (2014). A molecular survey of *Babesia* spp. and *Theileria* spp. in red foxes (*Vulpes vulpes*) and their ticks from Thuringia, Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 5(4): 386-391.
- Naucke, T. J. (2008). Babesiose/Piroplasmose – ein Update. *Veterinär Spiegel - Kleintiere & Heimtiere.* 1(08): 14-18.
- Naucke, T. J. (2011). Prävalenz von durch Ektoparasiten übertragenen Infektionskrankheiten (CVBDs) bei Import- und Reise-begleitenden Hunden in Deutschland und Prävention von CVBDs. *Tierärztl Umsch.* 66(7-8): 311 – 317.
- Negrobov, V. P., Borodin, V. S. (1964). Einige seltene Zeckenfunde im mittleren Teil der DDR. *Angew Parasitol.* 5: 107-111.
- Niemand, H. G., Suter, P. F., Kohn, B., Schwarz, G. (2011a). Babesiose, Piroplasmose. In: *Praktikum der Hundeklinik.* Stuttgart, Enke Verlag. ISBN 978-3-8304-1125-3. Kapitel 14.6.2.2, S. 375-77.
- Niemand, H. G., Suter, P. F., Kohn, B., Schwarz, G. (2011b). Borreliose (Lyme-Borreliose, Lyme-Krankheit, Lyme disease). In: *Praktikum der Hundeklinik.* Stuttgart, Enke Verlag. ISBN 978-3-8304-1125-3. Kapitel 14.4.2, S. 334-35.
- Nijhof, A. M., Bodaan, C., Postigo, M., Nieuwenhuijs, H., Opsteegh, M., Franssen, L., Jebbink, F., Jongejan, F. (2007). Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7(4): 585-595.
- Nilsson, K. (2009). Septicaemia with *Rickettsia helvetica* in a patient with acute febrile illness, rash and myasthenia. *J Infect.* 58(1): 79-82.
- Nilsson, K., Elfving, K., Pålson, C. (2010). *Rickettsia helvetica* in patient with meningitis, Sweden, 2006. *Emerg Infect Dis.* 16(3): 490-492.
- Nilsson, K., Lindquist, O., Pålson, C. (1999). Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet.* 354(9185): 1169-1173.
- Nosek, J. (1972). The ecology and public health importance of *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks in Central Europe. *Folia Parasitol (Praha).* 19(1): 93-102.
- O'Connor, T. P., Esty, K. J., Hanscom, J. L., Shields, P., Philipp, M. T. (2004). Dogs vaccinated with common Lyme disease vaccines do not respond to IR6, the conserved immunodominant region of the VlsE surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 11(3): 458-462.

- Obiegala, A., Król, N., Oltersdorf, C., Nader, J., Pfeffer, M. (2017). The enzootic life-cycle of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) and tick-borne rickettsiae: an epidemiological study on wild-living small mammals and their ticks from Saxony, Germany. *Parasit Vectors*. 10(1): 115.
- Obiegala, A., Pfeffer, M., Pfister, K., Karnath, C., Silaghi, C. (2015). Molecular examinations of *Babesia microti* in rodents and rodent - attached ticks from urban and sylvatic habitats in Germany. *Ticks Tick Borne Dis*. 6(4): 445-449.
- OIE - World Organisation for Animal Health (2014). Equine Piroplasmosis. In: OIE Terrestrial Manual 2017, Kapitel 2.5.8.
- OIE - World Organisation for Animal Health (2015). Bovine Anaplasmosis. In: OIE Terrestrial Manual 2017, Kapitel 2.4.1
- Øines, Ø., Storli, K., Brun-Hansen, H. (2010). First case of babesiosis caused by *Babesia canis canis* in a dog from Norway. *Vet Parasitol*. 171(3-4): 350-353.
- Oliver, J. H. (1989). Biology and systematics of ticks (acari: Ixodida). *Annu Rev Ecol Syst*. 20(1): 397-430.
- Oliver, J. H., Jr. (1996). Lyme borreliosis in the southern United States: a review. *J Parasitol*. 82(6): 926-935.
- Olivieri, E., Gazzonis, A. L., Zanzani, S. A., Veronesi, F., Manfredi, M. T. (2017). Seasonal dynamics of adult *Dermacentor reticulatus* in a peri-urban park in southern Europe. *Ticks and tick-borne diseases*. 8(5): 772-779.
- Olivieri, E., Zanzani, S. A., Latrofa, M. S., Lia, R. P., Dantas-Torres, F., Otranto, D., Manfredi, M. T. (2016). The southernmost foci of *Dermacentor reticulatus* in Italy and associated *Babesia canis* infection in dogs. *Parasit Vectors*. 9(1): 213.
- Opalińska, P., Wierzbicka, A., Asman, M. (2016). The PCR and nested PCR detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in *Dermacentor reticulatus* F. collected in a new location in Poland (Trzciel, Western Poland). *Acta Parasitol*. 61(4): 849-854.
- Ortuño, A., Pons, I., Quesada, M., Lario, S., Anton, E., Gil, A., Castellà, J., Segura, F. (2012). Evaluation of the presence of *Rickettsia slovaca* infection in domestic ruminants in Catalonia, Northeastern Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 12(12): 1019-1022.
- Ortuño, A., Quesada, M., López-Claessens, S., Castellà, J., Sanfeliu, I., Antón, E., Segura-Porta, F. (2007). The role of wild boar (*Sus scrofa*) in the eco-epidemiology of *R. slovaca* in Northeastern Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 7(1): 59-64.
- Ostfeld, R. S. (2009). Biodiversity loss and the rise of zoonotic pathogens. *Clin Microbiol Infect*. 15 Suppl 1: 40-43.
- Oteo, J. A., Blanco, J. R., Martínez de Artola, V., Ibarra, V. (2000). First report of human granulocytic ehrlichiosis from southern Europe (Spain). *Emerg Infect Dis*. 6(4): 430-432.
- Overzier, E., Pfister, K., Herb, I., Mahling, M., Böck Jr., G., Silaghi, C. (2013). Detection of tick-borne pathogens in roe deer (*Capreolus capreolus*), in questing ticks (*Ixodes ricinus*), and in ticks infesting roe deer in southern Germany. *Ticks Tick Borne Dis*. 4(4): 320-328.
- Palmer, G. H., Futse, J. E., Knowles, D. P., Jr., Brayton, K. A. (2006). Insights into mechanisms of bacterial antigenic variation derived from the complete genome sequence of *Anaplasma marginale*. *Ann N Y Acad Sci*. 1078(1): 15-25.
- Pantchev, N. (2012). Zeckenübertragene Reiseinfektionen beim Hund: Ehrlichiose und Babesiose. *Veterinär Spiegel - Kleintiere & Heimtiere*. 22(4): 162-170.
- Pantchev, N., Norden, N., Lorentzen, L., Rossi, M., Rossi, U., Brand, B., Dyachenko, V. (2009). Current surveys on the prevalence and distribution of *Dirofilaria* spp. in dogs in Germany. *Parasitol Res*. 105 Suppl 1: 63-74.
- Pantchev, N., Pluta, S., Huisinga, E., Nather, S., Scheufelen, M., Vrhovec, M. G., Schweinitz, A., Hampel, H., Straubinger, R. K. (2015). Tick-borne Diseases (Borreliosis, Anaplasmosis, Babesiosis) in German and Austrian Dogs: Status quo and Review of Distribution, Transmission, Clinical Findings, Diagnostics and Prophylaxis. *Parasitol Res*. 114 Suppl 1: 19-54.

- Parola, P., Paddock, C. D., Raoult, D. (2005). Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev.* 18(4): 719-756.
- Parola, P., Paddock, C. D., Socolovschi, C., Labruna, M. B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M. Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P. E., Raoult, D. (2013). Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev.* 26(4): 657-702.
- Parola, P., Roveery, C., Rolain, J. M., Brouqui, P., Davoust, B., Raoult, D. (2009). *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in tick-borne Rickettsioses. *Emerg Infect Dis.* 15(7): 1105-1108.
- Paulauskas, A., Radzijeuskaja, J., Mardosaitė-Busaitienė, D., Aleksandravičienė, A., Galdikas, M., Krikštolaitis, R. (2015). New localities of *Dermacentor reticulatus* ticks in the Baltic countries. *Ticks Tick Borne Dis.* 6(5): 630-635.
- Paulauskas, A., Radzijeuskaja, J., Rosef, O. (2012). Molecular detection and characterization of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 35(2): 187-195.
- Paziewska, A., Zwolińska, L., Harris, P. D., Bajer, A., Siński, E. (2010). Utilisation of rodent species by larvae and nymphs of hard ticks (Ixodidae) in two habitats in NE Poland. *Exp Appl Acarol.* 50(1): 79-91.
- Pekova, S., Vydra, J., Kabickova, H., Frankova, S., Haugvicova, R., Mazal, O., Cmejla, R., Hardekopf, D. W., Jancuskova, T., Kozak, T. (2011). *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* infection identified in 2 hematooncologic patients: benefit of molecular techniques for rare pathogen detection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 69(3): 266-270.
- Perret, J. L., Guerin, P. M., Diehl, P. A., Vlimant, M., Gern, L. (2003). Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. *J Exp Biol.* 206(Pt 11): 1809-1815.
- Pfäffle, M., Littwin, N., Petney, T. (2015). Host preferences of immature *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae) in a forest habitat in Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 6(4): 508-515.
- Philipp, M. T., Bowers, L. C., Fawcett, P. T., Jacobs, M. B., Liang, F. T., Marques, A. R., Mitchell, P. D., Purcell, J. E., Ratterree, M. S., Straubinger, R. K. (2001). Antibody response to IR6, a conserved immunodominant region of the VlsE lipoprotein, wanes rapidly after antibiotic treatment of *Borrelia burgdorferi* infection in experimental animals and in humans. *J Infect Dis.* 184(7): 870-878.
- Phipps, L. P., Otter, A. (2004). Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. *Vet Rec.* 154(13): 406-408.
- Piesman, J. (1993). Dynamics of *Borrelia burgdorferi* transmission by nymphal *Ixodes dammini* ticks. *J Infect Dis.* 167(5): 1082-1085.
- Piesman, J., Gern, L. (2004). Lyme borreliosis in Europe and North America. *Parasitology* 129: 191-220.
- Pluta, S., Hartelt, K., Oehme, R., Mackenstedt, U., Kimmig, P. (2010). Prevalence of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. in ticks and rodents in southern Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 1(3): 145-147.
- Pluta, S., Tewald, F., Hartelt, K., Oehme, R., Kimmig, P., Mackenstedt, U. (2009). *Rickettsia slovaca* in *Dermacentor marginatus* ticks, Germany. *Emerg Infect Dis.* 15(12): 2077-2078.
- Popov, V. L., Han, V. C., Chen, S. M., Dumler, J. S., Feng, H. M., Andreadis, T. G., Tesh, R. B., Walker, D. H. (1998). Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *J Med Microbiol.* 47(3): 235-251.
- Porchet, M. J., Sager, H., Muggli, L., Oppliger, A., Müller, N., Frey, C., Gottstein, B. (2007). A descriptive epidemiological study on canine babesiosis in the Lake Geneva region. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 149(10): 457-465.
- Portnoi, D., Sertour, N., Ferquel, E., Garnier, M., Baranton, G., Postic, D. (2006). A single-run, real-time PCR for detection and identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, based on the *hbb* gene sequence. *FEMS Microbiol Lett.* 259(1): 35-40.

- Potkonjak, A., Gutiérrez, R., Savić, S., Vračar, V., Nachum-Biala, Y., Jurišić, A., Kleinerman, G., Rojas, A., Petrović, A., Baneth, G., Harrus, S. (2016). Molecular detection of emerging tick-borne pathogens in Vojvodina, Serbia. *Ticks Tick Borne Dis.* 7(1): 199-203.
- Radolf, J. D., Caimano, M. J., Stevenson, B., Hu, L. T. (2012). Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol.* 10(2): 87-99.
- Radulović, Z., Chochlakis, D., Tomanović, S., Milutinović, M., Tselentis, Y., Psaroulaki, A. (2011). First detection of spotted fever group Rickettsiae in ticks in Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11(2): 111-115.
- Radzijeuskaja, J., Mardosaitė-Busaitienė, D., Aleksandravičienė, A., Paulauskas, A. (2017). Investigation of *Babesia* spp. in sympatric populations of *Dermacentor reticulatus* and *Ixodes ricinus* ticks in Lithuania and Latvia. *Ticks Tick Borne Dis.* 9(2): 270-274.
- Radzijeuskaja, J., Paulauskas, A., Aleksandravičienė, A., Jonauskaite, I., Stanko, M., Karbowski, G., Petko, B. (2015). New records of spotted fever group rickettsiae in Baltic region. *Microbes Infect.* 17(11-12): 874-878.
- Randolph, S. E., Gern, L., Nuttall, P. A. (1996). Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol Today.* 12(12): 472-479.
- Randolph, S. E., Miklisová, D., Lysy, J., Rogers, D. J., Labuda, M. (1999). Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis virus. *Parasitology.* 118 (Pt 2): 177-186.
- Rar, V., Golovljova, I. (2011). *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and "*Candidatus* Neoehrlichia" bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infect Genet Evol.* 11(8): 1842-1861.
- Rar, V. A., Fomenko, N. V., Dobrotvorsky, A. K., Livanova, N. N., Rudakova, S. A., Fedorov, E. G., Astanin, V. B., Morozova, O. V. (2005a). Tickborne pathogen detection, Western Siberia, Russia. *Emerg Infect Dis.* 11(11): 1708-1715.
- Rar, V. A., Maksimova, T. G., Zakharenko, L. P., Bolykhina, S. A., Dobrotvorsky, A. K., Morozova, O. V. (2005b). *Babesia* DNA detection in canine blood and *Dermacentor reticulatus* ticks in southwestern Siberia, Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 5(3): 285-287.
- Řeháček, J., Úrvölgyi, J., Kocianová, E., Jedlička, L. (1992). Susceptibility of some species of rodents to rickettsiae. *Folia Parasitol (Praha).* 39(3): 265-284.
- Reye, A. L., Stegny, V., Mishaeva, N. P., Velhin, S., Hübschen, J. M., Ignatyev, G., Muller, C. P. (2013). Prevalence of tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from different geographical locations in Belarus. *PLoS One.* 8(1): e54476.
- Richter, D., Allgöwer, R., Matuschka, F. R. (2002). Co-feeding transmission and its contribution to the perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia afzelii*. *Emerg Infect Dis.* 8(12): 1421-1425.
- Richter, D., Debski, A., Hubalek, Z., Matuschka, F. R. (2012a). Absence of Lyme disease spirochetes in larval *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12(1): 21-27.
- Richter, D., Kohn, C., Matuschka, F. R. (2012b). Absence of *Borrelia* spp., *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis, and *Anaplasma phagocytophilum* in questing adult *Dermacentor reticulatus* ticks. *Parasitol Res.* 112(1): 107-111.
- Richter, D., Matuschka, F. R. (2010). Elimination of Lyme disease spirochetes from ticks feeding on domestic ruminants. *Appl Environ Microbiol.* 76(22): 7650-7652.
- Richter, D., Matuschka, F. R. (2012a). "*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis," *Anaplasma phagocytophilum*, and Lyme disease spirochetes in questing European vector ticks and in feeding ticks removed from people. *J Clin Microbiol.* 50(3): 943-947.
- Richter, D., Matuschka, F. R. (2012b). Differential contribution of various dormice to the natural transmission cycle of Lyme disease spirochetes in Central Europe. In: Peckiana, Senckenberg Museum für Naturkunde Görlitz, Vol. 8, Proceedings (ed. by W. E. R. Xylander). 8th International Dormouse Conference. International Meeting Center St. Marienthal in Ostritz, Deutschland. S. 235-244.
- Richter, D., Schröder, B., Hartmann, N. K., Matuschka, F. R. (2013). Spatial stratification of various Lyme disease spirochetes in a Central European site. *FEMS Microbiol Ecol.* 83(3): 738-744.

- Ricketts, H. T. (1991). Some aspects of Rocky Mountain spotted fever as shown by recent investigations. *Rev Infect Dis.* 13(6): 1227-1240.
- Rieg, S., Schmoldt, S., Theilacker, C., de With, K., Wölfel, S., Kern, W. V., Dobler, G. (2011). Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA) acquired in Southwestern Germany. *BMC Infect Dis.* 11(1): 167.
- Rizzoli, A., Hauffe, H. C., Carpi, G., Vourc'h, G. I., Neteler, M., Rosá, R. (2011). Lyme borreliosis in Europe. *Euro Surveill.* 16(27): 2-9.
- Robert-Koch-Institut (1999). Zur Lyme-Borreliose in ausgewählten Bundesländern in den Jahren 1997 und 1998. In: *Epidemiologisches Bulletin* 22/1999. Berlin, Robert Koch-Institut. S. 163-167.
- Robert-Koch-Institut (2009). *Dermacentor reticulatus* als potenzieller Überträger von Infektionen beim Menschen. In: *Epidemiologisches Bulletin* 29/2009. Berlin, Robert Koch Institut. S. 275.
- Rogovskyy, A., Batool, M., Gillis, D. C., Holman, P. J., Nebogatkin, I. V., Rogovska, Y. V., Rogovskyy, M. S. (2018). Diversity of *Borrelia* spirochetes and other zoonotic agents in ticks from Kyiv, Ukraine. *Ticks Tick Borne Dis.* 9(2): 404-409.
- Rosendale, A. J., Farrow, D. W., Dunlevy, M. E., Fieler, A. M., Benoit, J. B. (2016). Cold hardiness and influences of hibernaculum conditions on overwintering survival of American dog tick larvae. *Ticks Tick Borne Dis.* 7(6): 1155-1161.
- Rothschild, C. M. (2013). Equine Piroplasmiasis. *J Equine Vet Sci.* 33(7): 497-508.
- Roux, V., Rydkina, E., Eremeeva, M., Raoult, D. (1997). Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol.* 47(2): 252-261.
- Rozej-Bielicka, W., Stypułkowska-Misiurewicz, H., Gołąb, E. (2015). Human babesiosis. *Przegl Epidemiol.* 69(3): 489-494, 605-488.
- Rubel, F., Brugger, K., Pfeffer, M., Chitimia-Dobler, L., Didyk, Y. M., Leverenz, S., Dautel, H., Kahl, O. (2016). Geographical distribution of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* in Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* 7(1): 224-233.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Oliver Jr., J. H. (2011). Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis.* 2(3): 123-128.
- Rudoler, N., Baneth, G., Eyal, O., van Straten, M., Harrus, S. (2012). Evaluation of an attenuated strain of *Ehrlichia canis* as a vaccine for canine monocytic ehrlichiosis. *Vaccine.* 31(1): 226-233.
- Rudolf, I., Hubálek, Z. (2003). Effect of the salivary gland and midgut extracts from *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae) on the growth of *Borrelia garinii* in vitro. *Folia Parasitol (Praha).* 50(2): 159-160.
- Rudolf, I., Venclíková, K., Blažejová, H., Betášová, L., Mendel, J., Hubálek, Z., Parola, P. (2016). First report of *Rickettsia raoultii* and *Rickettsia helvetica* in *Dermacentor reticulatus* ticks from the Czech Republic. *Ticks Tick Borne Dis.* 7(6): 1222-1224.
- Ruiz-Fons, F., Fernández-de-Mera, I. G., Acevedo, P., Höfle, U., Vicente, J., de la Fuente, J., Gortazár, C. (2006). Ixodid ticks parasitizing Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) and European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: geographical and temporal distribution. *Vet Parasitol.* 140(1-2): 133-142.
- Rulison, E. L., Kuczaj, I., Pang, G., Hickling, G. J., Tsao, J. I., Ginsberg, H. S. (2013). Flagging versus dragging as sampling methods for nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Vector Ecol.* 38(1): 163-167.
- Rumer, L., Graser, E., Hillebrand, T., Talaska, T., Dautel, H., Mediannikov, O., Roy-Chowdhury, P., Sheshukova, O., Donoso Mantke, O., Niedrig, M. (2011). *Rickettsia aeschlimannii* in *Hyalomma marginatum* ticks, Germany. *Emerg Infect Dis.* 17(2): 325-326.
- Rybářová, M., Honsová, M., Papoušek, I., Široký, P. (2017). Variability of species of *Babesia* Starcovici, 1893 in three sympatric ticks (*Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna*) at the edge of Pannonia in the Czech Republic and Slovakia. *Folia Parasitol (Praha).* 64.

- Sainz, A., Roura, X., Miró, G., Estrada-Peña, A., Kohn, B., Harrus, S., Solano-Gallego, L. (2015). Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasit Vectors*. 8(75).
- Sambrook, J., Russel, D. W. (2000). Chapter 5: Gel Electrophoresis of DNA and Pulsed-field Agarose Gel Electrophoresis; Protocol 1: Agarose Gel Electrophoresis. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-0879695774. S. 7.
- Samoylenko, I., Shpynov, S., Raoult, D., Rudakov, N., Fournier, P. E. (2009). Evaluation of *Dermacentor* species naturally infected with *Rickettsia raoultii*. *Clin Microbiol Infect*. 15 Suppl 2: 305-306.
- Sánchez-Vizcaíno, F., Wardeh, M., Heayns, B., Singleton, D. A., Tulloch, J. S., McGinley, L., Newman, J., Noble, P. J., Day, M. J., Jones, P. H., Radford, A. D. (2016). Canine babesiosis and tick activity monitored using companion animal electronic health records in the UK. *Vet Rec*. 179(14): 358.
- Santos-Silva, M., Sousa, R., Santos, A. S., Lopes, D., Queijo, E., Doreta, A., Vitorino, L., Bacellar, F. (2006). Ticks and tick-borne Rickettsiae surveillance in Montesinho Natural Park, Portugal. *Ann N Y Acad Sci*. 1078(1): 137-142.
- Sashika, M., Abe, G., Matsumoto, K., Inokuma, H. (2010). Molecular survey of rickettsial agents in feral raccoons (*Procyon lotor*) in Hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 63(5): 353-354.
- Schaarschmidt, D., Gilli, U., Gottstein, B., Marreros, N., Kuhnert, P., Daepfen, J. A., Rosenberg, G., Hirt, D., Frey, C. F. (2013). Questing *Dermacentor reticulatus* harbouring *Babesia canis* DNA associated with outbreaks of canine babesiosis in the Swiss Midlands. *Ticks Tick Borne Dis*. 4(4): 334-340.
- Schaefer, J. J., Kahn, J., Needham, G. R., Rikihisa, Y., Ewing, S. A., Stich, R. W. (2008). Antibiotic clearance of *Ehrlichia canis* from dogs infected by intravenous inoculation of carrier blood. *Ann N Y Acad Sci*. 1149: 263-269.
- Scheidemann, W., Liebisch, G., Liebisch, A., Budde, K. (2003). Equine Piroplasmose - Fallbericht einer akuten Infektion mit *Theileria equi* (syn. *Babesia equi*) in Deutschland. *Pferdeheilkunde*. 19(1): 16-20.
- Schex, S., Dobler, G., Riehm, J., Müller, J., Essbauer, S. (2011). *Rickettsia* spp. in wild small mammals in Lower Bavaria, South-Eastern Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 11(5): 493-502.
- Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M., Morrison, D. A. (2012). *Babesia*: A world emerging. *Infect Genet Evol*. 12(8): 1788-1809.
- Schreiber, C., Krücken, J., Beck, S., Maaz, D., Pachnicke, S., Krieger, K., Gross, M., Kohn, B., von Samson-Himmelstjerna, G. (2014). Pathogens in ticks collected from dogs in Berlin/Brandenburg, Germany. *Parasit Vectors*. 7(1): 535.
- Schulze, P. (1925). Endemisches Vorkommen einer mediterranen Zecke (*Dermacentor reticulatus* F.) in Deutschland. *Z Morphol Okol Tiere*. 3(5): 704-705.
- Schulze, T. L., Jordan, R. A., Hung, R. W. (1997). Biases associated with several sampling methods used to estimate abundance of *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*. 34(6): 615-623.
- Schwarz, A., Hönig, V., Vavrušková, Z., Grubhoffer, L., Balczun, C., Albring, A., Schaub, G. A. (2012). Abundance of *Ixodes ricinus* and prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in the nature reserve Siebengebirge, Germany, in comparison to three former studies from 1978 onwards. *Parasit Vectors*. 5(1): 268.
- Scoles, G. A., Ueti, M. W. (2015). Vector ecology of equine piroplasmosis. *Annu Rev Entomol*. 60: 561-580.
- Shpynov, S., Fournier, P. E., Rudakov, N., Tankibaev, M., Tarasevich, I., Raoult, D. (2004). Detection of a rickettsia closely related to *Rickettsia aeschlimannii*, "*Rickettsia heilongjiangensis*," *Rickettsia* sp. strain RpA4, and *Ehrlichia muris* in ticks collected in Russia and Kazakhstan. *J Clin Microbiol*. 42(5): 2221-2223.
- Shpynov, S., Fournier, P. E., Rudakov, N., Tarasevich, I., Raoult, D. (2006). Detection of members of the genera *Rickettsia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* in ticks collected in the Asiatic part of Russia. *Ann N Y Acad Sci*. 1078(1): 378-383.

- Sigg, L., Gerber, V., Gottstein, B., Doherr, M. G., Frey, C. F. (2010). Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in the Swiss horse population. *Parasitol Int.* 59(3): 313-317.
- Silaghi, C., Beck, R., Oteo, J. A., Pfeffer, M., Sprong, H. (2016). Neoehrlichiosis: an emerging tick-borne zoonosis caused by *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. *Exp Appl Acarol.* 68(3): 279-297.
- Silaghi, C., Hamel, D., Thiel, C., Pfister, K., Pfeffer, M. (2011). Spotted fever group rickettsiae in ticks, Germany. *Emerg Infect Dis.* 17(5): 890-892.
- Silaghi, C., Woll, D., Hamel, D., Pfister, K., Mahling, M., Pfeffer, M. (2012a). *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks, ticks parasitizing rodents and the parasitized rodents - Analyzing the host-pathogen-vector interface in a metropolitan area. *Parasit Vectors.* 5(1): 191.
- Silaghi, C., Woll, D., Mahling, M., Pfister, K., Pfeffer, M. (2012b). *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in rodents in an area with sympatric existence of the hard ticks *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*, Germany. *Parasit Vectors.* 5(1): 285.
- Silva-Pinto, A., de Lurdes Santos, M., Sarmiento, A. (2014). Tick-borne lymphadenopathy, an emerging disease. *Ticks Tick Borne Dis.* 5(6): 656-659.
- Siński, E., Welc-Falęciak, R., Zajkowska, J. (2016). *Borrelia miyamotoi*: A human tick-borne relapsing fever spirochete in Europe and its potential impact on public health. *Adv Med Sci.* 61(2): 255-260.
- Siroký, P., Kubelová, M., Bednář, M., Modrý, D., Hubálek, Z., Tkadlec, E. (2011). The distribution and spreading pattern of *Dermacentor reticulatus* over its threshold area in the Czech Republic - how much is range of this vector expanding? *Vet Parasitol.* 183(1-2): 130-135.
- Sixl, W., Petrovec, M., Marth, E., Wüst, G., Stünzner, D., Schweiger, R., Avšič-Županc, T. (2003). Investigation of *Anaplasma phagocytophila* infections in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks in Austria. *Ann N Y Acad Sci.* 990(1): 94-97.
- Skotarczak, B. (2002). Canine borreliosis - epidemiology and diagnostics. *Ann Agric Environ Med.* 9(2): 137-140.
- Skotarczak, B. (2003). Canine ehrlichiosis. *Ann Agric Environ Med.* 10(2): 137-141.
- Skotarczak, B. (2009). Adaptation factors of *Borrelia* for host and vector. *Ann Agric Environ Med.* 16(1): 1-8.
- Slovák, M., Labuda, M., Marley, S. E. (2002). Mass laboratory rearing of *Dermacentor reticulatus* ticks (Acarina, Ixodidae). *Biologia - Section Zoology.* 57(2): 261-266.
- Smith, R. D., Sells, D. M., Stephenson, E. H., Ristic, M. R., Huxsoll, D. L. (1976). Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic *Rickettsia*. *Am J Vet Res.* 37(2): 119-126.
- Solano-Gallego, L., Sainz, A., Roura, X., Estrada-Peña, A., Miró, G. (2016). A review of canine babesiosis: the European perspective. *Parasit Vectors.* 9(1): 336.
- Sonenshine, D. E., Roe, R. M. (2014). *Biology of Ticks*. Vol. 1, Second Edition. New York, Oxford University Press. ISBN 978-0-19-974405-3.
- Speck, S., Perseke, L., Petney, T., Skuballa, J., Pfäffle, M., Taraschewski, H., Bunnell, T., Essbauer, S., Dobler, G. (2013). Detection of *Rickettsia helvetica* in ticks collected from European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*, Linnaeus, 1758). *Ticks Tick Borne Dis.* 4(3): 222-226.
- Špitalská, E., Sparagano, O., Stanko, M., Schwarzová, K., Špitalský, Z., Škultéty, L., Havlíková, S. F. (2018). Diversity of *Coxiella*-like and *Francisella*-like endosymbionts, and *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii* as pathogens in the tick populations of Slovakia, Central Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* Article in press.
- Špitalská, E., Štefanidesová, K., Kocianová, E., Boldiš, V. (2012). *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia raoultii* in *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from Slovak Republic. *Exp Appl Acarol.* 57(2): 189-197.
- Sprong, H., Wielinga, P. R., Fonville, M., Reusken, C., Brandenburg, A. H., Borgsteede, F., Gaasenbeek, C., van der Giessen, J. W. (2009). *Ixodes ricinus* ticks are reservoir

- hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. *Parasit Vectors*. 2(1): 41.
- Sréter, T., Széll, Z., Varga, I. (2005). Spatial distribution of *Dermacentor reticulatus* and *Ixodes ricinus* in Hungary: evidence for change? *Vet Parasitol*. 128(3-4): 347-351.
- Stańczak, J. (2006). Detection of spotted fever group (SFG) rickettsiae in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae) in Poland. *Int J Med Microbiol*. 296 Suppl 40: 144-148.
- Stańczak, J., Biernat, B., Matyjasek, A., Racewicz, M., Zalewska, M., Lewandowska, D. (2016). Kampinos National Park: a risk area for spotted fever group rickettsioses, central Poland? *Exp Appl Acarol*. 70(3): 395-410.
- Stańczak, J., Biernat, B., Racewicz, M., Zalewska, M., Matyjasek, A. (2018). Prevalence of different *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks (Acari: Ixodidae) in north-eastern Poland. *Ticks Tick Borne Dis*. 9(2): 427-434.
- Stanek, G., Wormser, G. P., Gray, J., Strle, F. (2012). Lyme borreliosis. *Lancet*. 379(9814): 461-473.
- Stich, R. W., Schaefer, J. J., Bremer, W. G., Needham, G. R., Jittapalpong, S. (2008). Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. *Vet Parasitol*. 158(4): 256-273.
- Strube, C., Montenegro, V. M., Epe, C., Eckelt, E., Schnieder, T. (2010). Establishment of a minor groove binder-probe based quantitative real time PCR to detect *Borrelia burgdorferi* sensu lato and differentiation of *Borrelia spielmanii* by ospA-specific conventional PCR. *Parasit Vectors*. 3: 69.
- Stuen, S. (2007). *Anaplasma phagocytophilum* - the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Vet Res Commun*. 31 Suppl 1: 79-84.
- Stuen, S., Granquist, E. G., Silaghi, C. (2013). *Anaplasma phagocytophilum* - a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol*. 3(3): 31.
- Sun, Y., Xu, R. (2003). Ability of *Ixodes persulcatus*, *Haemaphysalis concinna* and *Dermacentor silvarum* ticks to acquire and transstadially transmit *Borrelia garinii*. *Exp Appl Acarol*. 31(1-2): 151-160.
- Svehlová, A., Berthová, L., Sallay, B., Boldiš, V., Sparagano, O. A., Spitalská, E. (2014). Sympatric occurrence of *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* ticks and *Rickettsia* and *Babesia* species in Slovakia. *Ticks Tick Borne Dis*. 5(5): 600-605.
- Świtaj, K., Chmielewski, T., Borkowski, P., Tylewska-Wierzbanowska, S., Olszynska-Krowicka, M. (2012). Spotted fever rickettsiosis caused by *Rickettsia raoultii* - case report. *Przegl Epidemiol*. 66(2): 347-350.
- Sykes, R. A., Makiello, P. (2017). An estimate of Lyme borreliosis incidence in Western Europe. *J Public Health (Oxf)*. 39(1): 74-81.
- Szekeres, S., Claudia Coipan, E., Rigó, K., Majoros, G., Jahfari, S., Sprong, H., Földvári, G. (2015). *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and *Anaplasma phagocytophilum* in natural rodent and tick communities in Southern Hungary. *Ticks Tick Borne Dis*. 6(2): 111-116.
- Szekeres, S., Docters van Leeuwen, A., Rigó, K., Jablonszky, M., Majoros, G., Sprong, H., Földvári, G. (2016). Prevalence and diversity of human pathogenic rickettsiae in urban versus rural habitats, Hungary. *Exp Appl Acarol*. 68(2): 223-226.
- Széll, Z., Sréter-Lancz, Z., Márialigeti, K., Sréter, T. (2006). Temporal distribution of *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* in Hungary. *Vet Parasitol*. 141(3-4): 377-379.
- Szymański, S. (1987). Seasonal activity of *Dermacentor reticulatus* (Fabricius 1794) (*Ixodidae*) in Poland III. Larvae and nymphs. *Acta Parasitol*. 32(3): 265-280.
- Tabar, M. D., Francino, O., Altet, L., Sánchez, A., Ferrer, L., Roura, X. (2009). PCR survey of vectorborne pathogens in dogs living in and around Barcelona, an area endemic for leishmaniosis. *Vet Rec*. 164(4): 112-116.
- Tack, W., Madder, M., De Frenne, P., Vanhellemont, M., Gruwez, R., Verheyen, K. (2011). The effects of sampling method and vegetation type on the estimated abundance of *Ixodes ricinus* ticks in forests. *Exp Appl Acarol*. 54(3): 285-292.

- Talagrand-Reboul, E., Boyer, P. H., Bergström, S., Vial, L., Boulanger, N. (2018). Relapsing Fevers: Neglected Tick-Borne Diseases. *Front Cell Infect Microbiol.* 8: 98.
- Teglas, M. B., Foley, J. (2006). Differences in the transmissibility of two *Anaplasma phagocytophilum* strains by the North American tick vector species, *Ixodes pacificus* and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol.* 38(1): 47-58.
- Theiler, A. (1910). *Anaplasma marginale* (gen. and spec. nov.): the marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. In: Report of the Government on Veterinary Bacteriology. Transvaal. Department of Agriculture, South Africa, 1908–1909. S. 7–64.
- Theodorou, K., Mylonakis, M. E., Siarkou, V. I., Leontides, L., Koutinas, A. F., Koutinas, C. K., Kritsepi-Konstantinou, M., Batzias, G., Flouraki, E., Eyal, O., Kontos, V., Harrus, S. (2013). Efficacy of rifampicin in the treatment of experimental acute canine monocytic ehrlichiosis. *J Antimicrob Chemother.* 68(7): 1619-1626.
- Thomas, R. J., Dumler, J. S., Carlyon, J. A. (2009). Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 7(6): 709-722.
- Thorner, A. R., Walker, D. H., Petri, W. A., Jr. (1998). Rocky mountain spotted fever. *Clin Infect Dis.* 27(6): 1353-1359; quiz 1360.
- Tijssse-Klasen, E., Hansford, K. M., Jahfari, S., Phipps, P., Sprong, H., Medlock, J. M. (2013). Spotted fever group rickettsiae in *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis punctata* ticks in the UK. *Parasit Vectors.* 6(1): 212.
- Tijssse-Klasen, E., Jameson, L. J., Fonville, M., Leach, S., Sprong, H., Medlock, J. M. (2011). First detection of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks in the UK. *Epidemiol Infect.* 139(4): 524-529.
- Tokhov, Y. M., Lutsuk, S. N., Dyachenko, Y. V. (2014). Phenology of ixodid ticks of the genus *Dermacentor* in the Central Ciscaucasia. *Entomol Rev.* 94(3): 426-433.
- Tomanović, S., Chochlakis, D., Radulović, Z., Milutinović, M., Cakić, S., Mihaljica, D., Tselentis, Y., Psaroulaki, A. (2013). Analysis of pathogen co-occurrence in host-seeking adult hard ticks from Serbia. *Exp Appl Acarol.* 59(3): 367-376.
- Töpfer, K. H., Straubinger, R. K. (2007). Characterization of the humoral immune response in dogs after vaccination against the Lyme borreliosis agent A study with five commercial vaccines using two different vaccination schedules. *Vaccine.* 25(2): 314-326.
- Turney, S., Gonzalez, A., Millien, V. (2014). The negative relationship between mammal host diversity and Lyme disease incidence strengthens through time. *Ecology.* 95(12): 3244-3250.
- Tylewska-Wierzbanska, S., Chmielewski, T., Kondrusik, M., Hermanowska-Szpakowicz, T., Sawicki, W., Sulek, K. (2001). First cases of acute human granulocytic ehrlichiosis in Poland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 20(3): 196-198.
- Ueti, M. W., Mealey, R. H., Kappmeyer, L. S., White, S. N., Kumpula-McWhirter, N., Pelzel, A. M., Grause, J. F., Bunn, T. O., Schwartz, A., Traub-Dargatz, J. L., Hendrickson, A., Espy, B., Guthrie, A. J., Fowler, W. K., Knowles, D. P. (2012). Re-emergence of the apicomplexan *Theileria equi* in the United States: elimination of persistent infection and transmission risk. *PLoS One.* 7(9): e44713.
- Uilenberg, G. (2006). *Babesia* - a historical overview. *Vet Parasitol.* 138(1-2): 3-10.
- Vannier, E. G., Diuk-Wasser, M. A., Ben Mamoun, C., Krause, P. J. (2015). Babesiosis. *Infect Dis Clin North Am.* 29(2): 357-370.
- Varloud, M., Liebenberg, J., Fourie, J. (2018). Early *Babesia canis* transmission in dogs within 24 h and 8 h of infestation with infected pre-activated male *Dermacentor reticulatus* ticks. *Parasit Vectors.* 11(1): 41.
- Vial, H. J., Gorenflot, A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Vet Parasitol.* 138(1-2): 147-160.
- von Loewenich, F. D., Geissdörfer, W., Disqué, C., Matten, J., Schett, G., Sakka, S. G., Bogdan, C. (2010). Detection of "*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis" in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant. *J Clin Microbiol.* 48(7): 2630-2635.

- von Wissmann, B., Hautmann, W., Sing, A., Hizo-Teufel, C., Fingerle, V. (2015). Assessing the risk of human granulocytic anaplasmosis and lyme borreliosis after a tick bite in Bavaria, Germany. *Int J Med Microbiol.* 305(7): 736-741.
- Wächter, M., Wölfel, S., Pfeffer, M., Dobler, G., Kohn, B., Moritz, A., Pachnicke, S., Silaghi, C. (2015). Serological differentiation of antibodies against *Rickettsia helvetica*, *R. raoultii*, *R. slovaca*, *R. monacensis* and *R. felis* in dogs from Germany by a micro-immunofluorescent antibody test. *Parasit Vectors.* 8: 126.
- Walker, D. H., Ismail, N., Olano, J. P., Valbuena, G., McBride, J. (2007). Pathogenesis, Immunity, Pathology, and Pathophysiology in Rickettsial Diseases. In: *Rickettsial Diseases*. Raoult, D. und Parola, P., Hrsg., CRC Press. ISBN 9781420019971. S. 16.
- Wamsley, H. L., Alleman, A. R., Johnson, C. M., Barbet, A. F., Abbott, J. R. (2011). Investigation of endothelial cells as an *in vivo* nidus of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Vet Microbiol.* 153(3-4): 264-273.
- Waner, T., Harrus, S. (2000). Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME). In: *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. Carmichael, L. E., Hrsg., International Veterinary Information Service (www.ivis.org). 5 Seiten.
- Waner, T., Harrus, S. (2013). Canine Monocytic Ehrlichiosis – From Pathology to Clinical Manifestations. *Refu Vet.* 68(1): 12-18.
- Weis, L. M. (2014). *Dermacentor reticulatus* und *Babesia canis*: eine Feldstudie zum Vorkommen in Bayern mit anschließender digitaler Geländeanalyse. Veterinärwissenschaftliches Department. München, Ludwig-Maximilians-Universität. Dissertation. 172 Seiten.
- Welinder-Olsson, C., Kjellin, E., Vaht, K., Jacobsson, S., Wennerås, C. (2010). First case of human "*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis" infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Microbiol.* 48(5): 1956-1959.
- Wielinga, P. R., Fonville, M., Sprong, H., Gaasenbeek, C., Borgsteede, F., van der Giessen, J. W. (2009). Persistent detection of *Babesia* EU1 and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* in the Netherlands during a 5-year surveillance: 2003-2007. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9(1): 119-122.
- Wirtgen, M., Nahayo, A., Linden, A., Garigliany, M., Desmecht, D. (2011). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in *Dermacentor reticulatus* ticks. *Vet Rec.* 168(7): 195.
- Wójcik-Fatla, A., Bartosik, K., Buczek, A., Dutkiewicz, J. (2012). *Babesia microti* in adult *Dermacentor reticulatus* ticks from eastern Poland. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12(10): 841-843.
- Wójcik-Fatla, A., Cisak, E., Zając, V., Sroka, J., Sawczyn, A., Dutkiewicz, J. (2013). Study on tick-borne rickettsiae in eastern Poland: I. Prevalence in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Amblyommidae). *Ann Agric Environ Med.* 20(2): 276-279.
- Wójcik-Fatla, A., Zając, V., Sawczyn, A., Cisak, E., Dutkiewicz, J. (2015). *Babesia* spp. in questing ticks from eastern Poland: prevalence and species diversity. *Parasitol Res.* 114(8): 3111-3116.
- Woldehiwet, Z. (2006). *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants in Europe. *Ann N Y Acad Sci.* 1078(1): 446-460.
- Woldehiwet, Z. (2010). The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol.* 167(2-4): 108-122.
- Wölfel, S., Speck, S., Essbauer, S., Thoma, B. R., Mertens, M., Werdermann, S., Niederstrasser, O., Petri, E., Ulrich, R. G., Wölfel, R., Dobler, G. (2017). High seroprevalence for indigenous spotted fever group rickettsiae in forestry workers from the federal state of Brandenburg, Eastern Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 8(1): 132-138.
- Wood, C. L., Lafferty, K. D. (2013). Biodiversity and disease: a synthesis of ecological perspectives on Lyme disease transmission. *Trends Ecol Evol.* 28(4): 239-247.
- Wright, W. F., Riedel, D. J., Talwani, R., Gilliam, B. L. (2012). Diagnosis and management of Lyme disease. *Am Fam Physician.* 85(11): 1086-1093.
- Yabsley, M. J., Shock, B. C. (2013). Natural history of Zoonotic *Babesia*: Role of wildlife reservoirs. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2: 18-31.

- Yssouf, A., Flaudrops, C., Drali, R., Kernif, T., Socolovschi, C., Berenger, J. M., Raoult, D., Parola, P. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of tick vectors. *J Clin Microbiol.* 51(2): 522-528.
- Zahler, M., Gothe, R. (1995a). Effect of temperature and humidity on egg hatch, moulting and longevity of larvae and nymphs of *Dermacentor reticulatus* (Ixodidae). *Appl Parasitol.* 36(1): 53-65.
- Zahler, M., Gothe, R. (1995b). Effect of temperature and humidity on longevity of unfed adults and on oviposition of engorged females of *Dermacentor reticulatus* (Ixodidae). *Appl Parasitol.* 36(3): 200-211.
- Zahler, M., Gothe, R., Rinder, H. (1995). Genetic evidence against a morphologically suggestive conspecificity of *Dermacentor reticulatus* and *D. marginatus* (Acari:Ixodidae). *Int J Parasitol.* 25(12): 1413-1419.
- Zahler, M., Steffenz, T., Lutz, S., Hähnel, W.-C., Rinder, H., Gothe, R. (2000). *Babesia canis* und *Dermacentor reticulatus* in München, ein neuer Naturherd in Deutschland. *Tierärztliche Praxis.* 28(58): 116-120.
- Zajac, V., Wójcik-Fatla, A., Cisak, E., Sroka, J., Sawczyn, A., Dutkiewicz, J. (2013). Study on tick-borne rickettsiae in eastern Poland. II. Serological response of the occupationally exposed populations. *Ann Agric Environ Med.* 20(2): 280-282.
- Zajac, V., Wójcik-Fatla, A., Sawczyn, A., Cisak, E., Sroka, J., Kloc, A., Zajac, Z., Buczek, A., Dutkiewicz, J., Bartosik, K. (2017). Prevalence of infections and co-infections with 6 pathogens in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med.* 24(1): 26-32.
- Zajac, Z., Katarzyna, B., Buczek, A. (2016). Factors influencing the distribution and activity of *Dermacentor reticulatus* (F.) ticks in an anthropopressure-unaaffected area in central-eastern Poland. *Ann Agric Environ Med.* 23(2): 270-275.
- Zemtsova, G., Killmaster, L. F., Mumcuoglu, K. Y., Levin, M. L. (2010). Co-feeding as a route for transmission of *Rickettsia conorii israelensis* between *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Exp Appl Acarol.* 52(4): 383-392.
- Zhao, H., Bao, F. F., Liu, A. (2017). Safety, immunogenicity, and efficacy of *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (OspA) vaccine: A meta-analysis. *J Infect Dev Ctries.* 11(1): 1-9.
- Zhou, X., Xia, S., Huang, J. L., Tambo, E., Zhuge, H. X., Zhou, X. N. (2014). Human babesiosis, an emerging tick-borne disease in the People's Republic of China. *Parasit Vectors.* 7: 509.
- Zivkovic, Z., Nijhof, A. M., de la Fuente, J., Kocan, K. M., Jongejan, F. (2007). Experimental transmission of *Anaplasma marginale* by male *Dermacentor reticulatus*. *BMC Vet Res.* 3: 32.
- Zobba, R., Ardu, M., Niccolini, S., Chessa, B., Manna, L., Cocco, R., Parpaglia, M. L. P. (2008). Clinical and Laboratory Findings in Equine Piroplasmiasis. *J Equine Vet Sci.* 28(5): 301-308.
- Zygner, W., Górski, P., Wędrychowicz, H. (2009). New localities of *Dermacentor reticulatus* tick (vector of *Babesia canis canis*) in central and eastern Poland. *Pol J Vet Sci.* 12(4): 549-555.
- Zygner, W., Jaros, S., Wędrychowicz, H. (2008). Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia afzelii*, and *Anaplasma phagocytophilum* infection in hard ticks removed from dogs in Warsaw (central Poland). *Vet Parasitol.* 153(1-2): 139-142.

9 Anhang

9.1 Rohdaten: gesammelte Zecken, Messwerte der Temperatur und relativen Luftfeuchtigkeit für jeden Fangtermin

Tab. 24: Rohdaten der Felduntersuchungen für den Standort Gatow

Gesammelte *D. reticulatus* waren ausschließlich adult; W = Weibchen; M = Männchen; N = Nymphen; L = Larven; Temp = Temperatur; RH = relative Luftfeuchtigkeit; Extr. = Anzahl verwendeter weiblicher Zecken für die DNA-Extraktion; ^{a)} DNA-Extraktion zusätzlicher Zecken entsprechend Kapitel 3.2.3.1

Datum	Fangdauer (min)	Temp (°C)	RH (%)	<i>D. reticulatus</i>			<i>I. ricinus</i>		
				Total	W/M	Extr.	Total	N/L	W/M
09.04.2010	60	11	60	63	41/22	41	0	0/0	0/0
22.04.2010	60	10	47	58	37/21	37	0	0/0	0/0
17.05.2010	60	12	54	19	10/9	10	11	6/0	2/3
07.06.2010	60	22	55	1	1/0	1	21	15/0	1/5
23.06.2010	60	19	51	1	0/1	0	10	0/0	7/3
08.07.2010	60	25	31	0	0/0	0	1	0/0	1/0
26.07.2010	60	22	39	0	0/0	0	0	0/0	0/0
06.08.2010	60	24	59	2	0/2	0	6	0/0	3/3
19.08.2010	60	19	51	40	17/23	5	4	0/0	3/1
06.09.2010	60	16,8	45	154	74/80	21	1	0/0	1/0
20.09.2010	60	17,5	56	218	127/91	35	1	0/0	1/0
05.10.2010	60	15,4	75	270	156/114	43	2	0/0	1/1
25.10.2010	60	8	57	184	96/88	27+6 ^{a)}	1	0/0	0/1
10.11.2010	60	8,5	80	204	110/94	30	0	0/0	0/0
18.01.2011	60	6	73	182	97/85	23	1	0/0	1/0
08.02.2011	60	8	57	79	46/33	11	0	0/0	0/0
01.03.2011	60	5,5	47	54	31/23	7	0	0/0	0/0
10.03.2011	60	10,5	44	45	27/18	6	0	0/0	0/0
24.03.2011	60	15	44	134	78/56	19	1	0/0	1/0
05.04.2011	60	16	44	162	101/61	24	15	2/0	4/9
20.04.2011	60	21	30	111	67/44	16	7	0/0	4/3
05.05.2011	60	13	33	98	67/31	16	4	0/0	2/2
19.05.2011	60	25	41	19	9/10	2	18	5/0	8/5
03.06.2011	60	25	35	2	1/1	1	13	1/0	3/9
17.06.2011	60	21	37	0	0/0	0	1	0/0	0/1
29.06.2011	60	30	26	0	0/0	0	1	0/0	1/0
19.07.2011	60	24	39	0	0/0	0	0	0/0	0/0
03.08.2011	60	27	52	0	0/0	0	0	0/0	0/0
17.08.2011	60	24	58	29	12/17	3	1	0/0	1/0
02.09.2011	60	19	58	132	67/65	15	1	0/0	1/0
21.09.2011	60	19	55	211	124/87	27	3	0/0	1/2
05.10.2011	70	18,5	73	315	182/133	40	4	0/0	4/0
21.10.2011	60	11	55	170	86/84	19	2	0/0	2/0
04.11.2011	60	11	67	152	81/71	17	1	0/0	0/1
17.11.2011	60	-0,5	85	33	19/14	4	0	0/0	0/0

Anhang

Tab. 25: Rohdaten der Felduntersuchungen für den Standort Falkenberg

Gesammelte *D. reticulatus* waren ausschließlich adult; W = Weibchen; M = Männchen; N = Nymphen; L = Larven; Temp = Temperatur; RH = relative Luftfeuchtigkeit; Extr. = Anzahl verwendeter weiblicher Zecken für die DNA-Extraktion

Datum	Fangdauer (min)	Temp (°C)	RH (%)	<i>D. reticulatus</i>			<i>I. ricinus</i>		
				Total	W/M	Extr.	Total	N/L	W/M
30.03.2010	45	11	43	21	9/12	9	11	0/0	3/8
04.05.2010	60	11	72	4	4/0	4	44	17/0	14/13
17.05.2010	60	14	52	2	2/0	2	40	33/0	2/5
08.06.2010	60	20	59	0	0/0	0	32	21/0	4/7
24.06.2010	60	23	37	0	0/0	0	30	18/0	7/5
16.07.2010	60	29	30	0	0/0	0	17	10/0	6/1
28.07.2010	60	23	49	0	0/0	0	34	23/0	4/7
11.08.2010	60	22	56	1	0/1	0	38	26/0	7/5
20.08.2010	20	21,8	51	2	1/1	1	7	2/0	4/1
06.09.2010	60	13	59	58	29/29	29	31	6/0	17/8
23.09.2010	60	22,3	51	89	48/41	48	15	7/0	1/7
07.10.2010	60	16,8	69	83	46/37	46	12	4/0	1/7
27.10.2010	60	10,2	60	96	61/35	61	0	0/0	0/0
10.11.2010	30	8,7	81	44	30/14	31	2	0/0	1/1
19.01.2011	60	4,3	79	52	28/24	23	0	0/0	0/0
16.02.2011	60	1,5	56	3	1/2	1	0	0/0	0/0
01.03.2011	60	6	45	16	11/5	9	0	0/0	0/0
22.03.2011	60	14,5	50	56	38/18	31	0	0/0	0/0
31.03.2011	60	15	56	70	40/30	32	29	8/0	10/11
15.04.2011	60	13	55	36	26/10	21	20	2/0	6/12
29.04.2011	60	14,5	67	9	8/1	7	33	13/0	9/11
11.05.2011	60	25	33	1	1/0	1	28	19/0	2/7
25.05.2011	60	21	29	0	0/0	0	12	8/0	2/2
10.06.2011	60	21	35	0	0/0	0	20	13/0	4/3
22.06.2011	60	29	30	0	0/0	0	49	35/0	9/5
12.07.2011	60	28	33	0	0/0	0	10	4/0	5/1
27.07.2011	60	22	60	0	0/0	0	8	5/0	2/1
10.08.2011	60	19	58	0	0/0	0	4	0/3	0/1
29.08.2011	60	20	48	32	14/18	8	7	6/0	0/1
15.09.2011	60	19	50	52	34/18	19	5	3/0	2/0
29.09.2011	60	22	42	82	36/46	20	9	4/0	3/2
13.10.2011	60	15	55	79	48/31	26	1	1/0	0/0
25.10.2011	60	11	65	62	42/20	23	1	0/0	1/0
07.11.2011	60	14	65	67	45/22	24	1	0/0	0/1
23.11.2011	50	1	85	12	9/3	5	0	0/0	0/0

Anhang

Tab. 26: Rohdaten der Felduntersuchungen für den Standort Königs Wusterhausen

Gesammelte *D. reticulatus* waren ausschließlich adult; W = Weibchen; M = Männchen; N = Nymphen; L = Larven; Temp = Temperatur; RH = relative Luftfeuchtigkeit; Extr. = Anzahl verwendeter weiblicher Zecken für die DNA-Extraktion; ^{a)} DNA-Extraktion zusätzlicher Zecken entsprechend Kapitel 3.2.3.1

Datum	Fangdauer (min)	Temp (°C)	RH (%)	<i>D. reticulatus</i>			<i>I. ricinus</i>		
				Total	W/M	Extr.	Total	N/L	W/M
16.04.2010	60	14	37	35	26/9	26	6	0/0	4/2
30.04.2010	60	24	34	24	20/4	20	12	1/0	6/5
21.05.2010	60	18	67	8	4/4	4	18	10/0	2/6
17.06.2010	60	17	50	0	0/0	0	15	4/0	6/5
30.06.2010	60	22	52	0	0/0	0	4	2/0	1/1
15.07.2010	60	26	50	0	0/0	0	0	0/0	0/0
02.08.2010	60	22	64	1	0/1	0	9	2/0	5/2
16.08.2010	60	22	51	21	8/13	5	8	0/0	4/4
03.09.2010	60	16,5	49	72	41/31	25	12	2/1	2/7
18.09.2010	60	14,2	54	132	77/55	46	7	0/0	4/3
30.09.2010	60	11,5	62	156	94/62	57+6 ^{a)}	8	2/0	2/4
22.10.2010	60	8,2	82	98	49/49	30	0	0/0	0/0
03.11.2010	60	13	75	108	62/46	37	0	0/0	0/0
29.11.2010	60	-1,1	79	1	1/0	1	0	0/0	0/0
19.01.2011	60	3,4	83	71	49/22	22	0	0/0	0/0
15.02.2011	60	1	45	2	1/1	1	0	0/0	0/0
02.03.2011	60	5	39	36	19/17	8	0	0/0	0/0
22.03.2011	60	14,9	48	105	58/47	26	0	0/0	0/0
31.03.2011	60	16	54	114	68/46	30	0	0/0	0/0
18.04.2011	60	18	38	90	61/29	27	10	1/0	3/6
03.05.2011	60	12	33	26	17/9	7	12	0/0	7/5
11.05.2011	60	25	33	5	4/1	2	10	0/0	4/6
25.05.2011	60	22	31	2	1/1	1	12	0/0	7/5
10.06.2011	60	22	39	1	1/0	1	14	1/0	7/6
22.06.2011	60	25	59	0	0/0	0	5	1/0	1/3
12.07.2011	60	30	32	0	0/0	0	0	0/0	0/0
27.07.2011	60	24	53	0	0/0	0	4	2/0	1/1
16.08.2011	60	20	55	13	7/6	5	7	0/0	5/2
29.08.2011	60	19	56	52	25/27	18	2	0/0	1/1
15.09.2011	60	16	65	54	34/20	24	3	0/0	1/1
29.09.2011	60	23	64	61	23/38	16	4	0/0	4/0
13.10.2011	60	13	61	52	33/19	23	1	0/0	0/1
25.10.2011	60	9	70	35	18/17	13	0	0/0	0/0
08.11.2011	60	12	65	45	25/20	18	0	0/0	0/0
24.11.2011	50	5	80	13	11/2	8	0	0/0	0/0

Anhang

Tab. 27: Rohdaten der Felduntersuchungen für den Standort Güterfelde

Gesammelte *D. reticulatus* waren ausschließlich adult; W = Weibchen; M = Männchen; N = Nymphen; L = Larven; Temp = Temperatur; RH = relative Luftfeuchtigkeit; Extr. = Anzahl verwendeter weiblicher Zecken für die DNA-Extraktion; ^{a)} DNA-Extraktion zusätzlicher Zecken entsprechend Kapitel 3.2.3.1; ^{b)} Anzahl enthält zusätzlich Zecken, die an dem Tag von einer zweiten Person gesammelt wurden

Datum	Fangdauer (min)	Temp (°C)	RH (%)	<i>D. reticulatus</i>			<i>I. ricinus</i>		
				Total	W/M	Extr.	Total	N/L	W/M
23.03.2010	75	14	45	33	14/19	30 ^{b)}	0	0/0	0/0
07.04.2010	60	17	30	37	23/14	45 ^{b)} +1 ^{a)}	1	0/0	1/0
22.04.2010	60	10	49	15	9/6	9	4	0/0	3/1
14.05.2010	60	10	75	1	1/0	1	22	8/0	8/6
21.05.2010	60	17	72	6	5/1	5	8	0/0	5/3
07.06.2010	60	21	51	1	0/1	0	6	2/0	2/2
16.06.2010	60	18	42	0	0/0	0	5	1/0	3/1
09.07.2010	60	30	30	0	0/0	0	0	0/0	0/0
19.07.2010	60	22	47	0	0/0	0	11	10/0	1/0
06.08.2010	60	22	66	1	0/1	0	15	10/1	2/2
19.08.2010	60	21	48	21	9/12	3	6	3/0	1/2
06.09.2010	60	16,2	49	59	34/25	12	8	6/0	2/0
20.09.2010	60	16,4	57	138	65/73	23+2 ^{a)}	2	1/0	1/0
05.10.2010	60	15,7	71	254	146/108	50+3 ^{a)}	0	0/0	0/0
25.10.2010	60	9	51	161	94/67	33	0	0/0	0/0
09.11.2010	60	5,1	83	179	113/66	39	0	0/0	0/0
12.01.2011	60	4,5	67	50	35/15	12	0	0/0	0/0
08.02.2011	60	7,8	48	101	56/45	20	0	0/0	0/0
24.02.2011	30	1	29	0	0/0	0	0	0/0	0/0
10.03.2011	60	9	45	60	36/24	12	0	0/0	0/0
24.03.2011	60	15,5	42	166	92/74	31	0	0/0	0/0
05.04.2011	60	14	45	147	90/57	31	10	4/0	3/3
21.04.2011	60	22	25	45	33/12	11	30	6/0	13/11
06.05.2011	60	22,5	24	17	14/3	5	0	0/0	0/0
20.05.2011	60	23	54	10	6/4	2	8	2/0	3/3
06.06.2011	60	30	37	1	1/0	1	2	1/0	1/0
20.06.2011	60	17	58	0	0/0	0	3	0/0	1/2
11.07.2011	60	22,5	70	0	0/0	0	2	1/0	1/0
25.07.2011	60	15	87	0	0/0	0	5	½	2/0
09.08.2011	60	15	65	0	0/0	0	0	0/0	0/0
24.08.2011	60	29	40	27	12/15	4	0	0/0	0/0
13.09.2011	60	20	69	96	44/52	13	2	0/0	1/1
30.09.2011	60	23	55	183	80/103	24	0	0/0	0/0
14.10.2011	60	12	58	176	106/70	32	0	0/0	0/0
27.10.2011	60	11	85	146	94/52	28	1	1/0	0/0
15.11.2011	60	1	90	57	35/22	10	0	0/0	0/0
30.11.2011	60	10	55	77	45/32	14	0	0/0	0/0
15.12.2011	30	4,5	88	21	13/8	-	0	0/0	0/0

Anhang

Fortsetzung Tab. 27

Datum	Fangdauer (min)	Temp (°C)	RH (%)	<i>D. reticulatus</i>			<i>I. ricinus</i>		
				Total	W/M	Extr.	Total	N/L	W/M
06.01.2012	60	2,5	83	25	13/12	-	0	0/0	0/0
25.01.2012	60	-0,5	76	6	1/5	-	0	0/0	0/0
16.02.2012	60	2,6	50	2	1/1	-	0	0/0	0/0
02.03.2012	60	7,5	75	121	73/48	-	1	0/0	0/1
19.03.2012	60	10	38	64	39/25	-	0	0/0	0/0
05.04.2012	60	6,7	61	58	42/16	-	4	0/0	3/1

9.2 PCR-Bedingungen zum Nachweis einer 18S rRNA Gensequenz von Piroplasmen

Das Temperaturprotokoll umfasste die Aktivierung der Polymerase bei 98 °C für 30 sec, die Amplifikationsphase (50 Zyklen) bei 98 °C für 10 sec (Denaturierung), 60,5 °C für 30 sec (Annealing) und 72 °C für 15 sec (Elongation) sowie die finale Extension bei 72 °C für 10 min.

Tab. 28: Reaktionsansatz (20 µl) zur Amplifikation eines Fragmentes der 18S rRNA Region verschiedener Piroplasmen

Volumen	Reagenz
4 µl	5 × Phusion HF Puffer
2 µl	Magnesiumchlorid (25 mM)
0,4 µl	dNTP Mix (10 mM each)
0,5 µl	bathF-kurz-R (FP) (10 µM) 5' ACACRGGGAGGTAGTGACAA 3'
0,5 µl	bathR.kurz (RP) (10 µM) 5' TAAGAATTTACCTCTGACAGT 3'
0,2 µl	Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2 U/µl)
1 µl	Template DNA (60-120 ng/µl)
11,4 µl	Nukleasefreies Wasser

9.3 Alignment der ITS-1 Sequenzen verschiedener *Babesia* spp.

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

B. canis          TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACATTGATG-----ATAGT
B. vogeli        TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACATTGATG-----GTACC
B. cf. microti   TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTCTTATATTGTT-----TAAATTTTTAGTTA
B. rossi         TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACATTGAAAT-----GTACT
B. caballi       TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACATGGTTTTTGGTGGCGCTTTGGCGCTGGGGAGT
B. divergens     TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACATTGAATA-----CCCTTGCACA----ATAGT
B. major         TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACATTTTGAC-----CTCACT
B. bigemina      TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACATTATTGT-TTGCCGTTTTCGGCGT---GCGCT
B. sp.EU1        TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACATTGATT-----TGTTTTGACTTTTTTGTGCT
B. microti       TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTCTTATCAGAAT-----TC--TTTGTATCCC
***** **

B. canis          TGGCACTTGGTGCCG--TTTGCGG-----GGGCTGCTG-----
B. vogeli        TA-GCACTTGTGCT--TTCGCGG-----GACGCGCT-----
B. cf. microti   AATTTGGTTCGTGCGATATATATATAAAAA-----TCCGCACCTTATTTTTT----
B. rossi         TTTGAGCATGTGCT--CTTTTTT-----G-CGTGTC-----
B. caballi       GTTTGAGCTTTGCA--GTCCTTGTGGGCTAGCGCGGCAATCGTTGCGTCCAG----C
B. divergens     GCTCGGCTTCGGCA--TTTACGT-----TGTGTAAGCTTGCTTGCAG----C
B. major         TGACTGACTGGGCGCAAGTCTAGTCCAGG-----GTTACCAACATCCTCACCAGGCA
B. bigemina      GGTCGCAGTGGTGC--GGACTCGTCCGGCGCGTTTTTCTAA--AATGCGTTCCT----C
B. sp.EU1        GCTCGGTTGGTGTACGATGTGCGTCAAGGACGCAGCTGCGCGGCGGTTCCAC
B. microti       ATTTGGGTTACGTGGCCCGTGGCCTTGG-----TCGCACCTTCTA-----

B. canis          -----CTTSAGRACSTSG-TTCTGTTGCAGTGGGTGCCCGGCT-----GGC
B. vogeli        -----GTCGAGG--TTG-TCCTSGG-CGGCGGT--CTCGTCT-----GGC
B. cf. microti   -----AATTAATAAAGTAAATTTTTATATATTGTATATATGTTTAAATATATA-TAAT
B. rossi         -----CTTCAG--TAG-TGCTGT--TGGCG--CGCGT-T-----GGC
B. caballi       AATG--GGCACTGCTCACTCG-CTCTCCTGCAACGTGCGTATGCCT--TGTGCT-GCGC
B. divergens     TGTG--ACTCTACGTCAATGG-TCCACTTTGGTGGTTTTCGTATTTGTCGTTGCCMTGGC
B. major         CATCCAGCACTAGTGTGACATGTATCCGGTGTGATACTGGTTTTAC----CCACTGC
B. bigemina      TG-G--GCTTCCACTGCTTCT-TGCGCCAGCAACGCGCCCTTGCCT--TTTGCTCGGGT
B. sp.EU1        TGTGTGGGTTCCGCTTTGTGGATTCTCGCATTGTGGCCTCGTGGCG-CGGTCTGCTGGC
B. microti       -----GAGTGGCCTTGGACGTAGCGGCTGCAACTTTT---TGTT-GGGC

B. canis          AACGAA-GC--CGGCGA-----ATTGCCGTTTTTCCCTG---ATG-GGCCTTGCCCC
B. vogeli        AACGGG-GC--CGGCGA-----ST-CGCCGTTCTACCCTK---TTG-GGCCTTGCCCC
B. cf. microti   AATATA-AAAATTGACCAAATGAACGTCCGGTGTGAATTTTT---ATATATATATATATA
B. rossi         AACGGG-GT--TGGCGATG--GCTGCTCCCATCTCAGCCTT---GCGTGGCGTTGCCCC
B. caballi       TACCTG-GC-TCGTCACTGTAGTCTGACTGCAATGGCGAGA----CGGGACGTTGCCCTC
B. divergens     GACGTG-GTTTTCGGTCTTGGTTCCGTTTTCCATCCCTGCGCTTTGCGTGGGACGTTGCC
B. major         AACGTGCATGGTTCCATTGGGACCTTGCTTGCCCTGGATTCCAATTCCAGGACGTTGCCGCT
B. bigemina      TGCCCG-GCGTTTTGCTGGGGCGTTGCCCTCC-TCCCACCC----CGTGCTCGCGTTGT
B. sp.EU1        GACGTG-GTTTTCGGTCTTGGTTCCGTTTTCC-TTCTGCGCTT--GCGCGGGACGTTGCC
B. microti       CGCATC-CCTGTGTGGCACAAAGCGCGTGGAAAGCGGGTTT---GTCTGCACGGGGC--
*

B. canis          TCCC--ACCCCACT-GGGGCGTTGCTTTTRGCT-----CTGCCCC
B. vogeli        CTCTCCACCCCACT-GGGGCGTTGCGTAAAGCT-----CTGCCCC
B. cf. microti   ATTCTCACCATCCCCCGTATTAATATTATTTA-----ATATTCT
B. rossi         TTCT--ACCCCGCT-TGGGCGTTGCACTGGGC-----CATGTTA
B. caballi       ---CC-ACCCCTCT-GTCGCGTAGC-ATCGTGGTCAA-----CAGTCACTGGC
B. divergens     CTCCC-ACCCACCCGGGTGTATGTTTACTGCGGTGTAACACTACTGTAGTTGGCGTACACTT
B. major         CTCTCCCACCCCTCCGAGGAGTGCGCCAGACTCAACGG-----GTTATGCTCTT
B. bigemina      ---CG-TCGCTATT-GCAGCGT-GC-TCTGCGAGCGGG-----TTCCGCCCCCGTC
B. sp.EU1        -TCCC-ACCCCTCCAGCTGTGTGGCTTTGGCCAT-----CACAAAT
B. microti       GTTCTCACT-CCCAAGGTATTT---TCCCTGG-----GCCCTC

B. canis          GGGTTATGCCCCGAGC-----TGCGTGT-----TGAGCGCGG-
B. vogeli        GGGTTAGGCCCCGAGC-----GTGGATTCCGT-----TGTTTCCGG
B. cf. microti   GGGGCGTTCTCACTCCTAAGGTATTTAATCTTCTTCCCATAT---GTTAGATCATT
B. rossi         GGTGTGGCTGCCGTGT-----GTGCTGCGCT-----TGGGTTATG-
B. caballi       AGTTGCTATGATGTTT-----TGCGACGGTTATGCCCCCGTG--TGCCTGTAGCTG
B. divergens     GGGTTATGCCGTGTGATACTGATGTTACTAGTGATTGCTCTTTGAGTGGTTGTTAGTGC
B. major         GGTTTTTGTACCAAGT-----GATGACGAGTGGTCCAACGTC--GTTGACGTGTG-
B. bigemina      CGTGCTAGCATGTC-----GCGTTTTGTTGCCGTGTC--GTCTGGCAGCGG
B. sp.EU1        GGGTTATGCCTCGTC-----ATGTTGT--GCAGCAGCTCT-----GTTGTT-GTGC
B. microti       TGTGT-TAGATCATTCTAACGGGCTTTGGGATTTATACTGTTTTC--CGCTGAGAAGTGC
*

```

Anhang

```

B. canis          -----CCTGGGGATGTTGGT-----GTGCGTGT----G----CRCTCC
B. vogeli        G-----CTTGGGGAT-GTGGC-----GCGCCTGG----G----CGCGTC
B. cf. microti   TAACGG---GTTGGATGTGTTATT-----TACCGTTGCCGAG-----AAATG
B. rossi         -----CCTGGGAGT-TTGG-----GTCCTGG----GATGCCGTCTT
B. caballi       TATGGGTGCGCGGGGATACTGCTGTCTCACGTAAGTGTGACGGTGGTGGGCAATCG
B. divergens     TACAGTGTGTACCGATGCTGCTCGTGGATCTAATAGATTCAA--GCAGTTGCTGCTTC
B. major         -----TGGGCAC-TTGAT-----CCTAACCAGC-----CCAATTG
B. bigemina      T-----CGGGGGATGTCGCTGCGCCGTGTG-TGCGAGCGACCGCCGTGT---CTCA
B. sp.EU1        GTCA---TGTGGGGATGCCGCT----GTGTGCTTCGCTCAA--GTGGCTGCCGCT-
B. microti       CCCC-----TGGCTTTCTTGGC-----TGCTG--AACGTG-----ACTTT
  
```

```

B. canis          GACCGGTCTGTGACCACTGCGGGCCTGTCCCGACT-AGCAACTCCACTG-----
B. vogeli        A--GGGTCTYTGACCTCTG-CGGCTTGGCCGA-TT-TGCAACTCCGCTTG-----
B. cf. microti   CTCTGTGACATTCTTGGCTTGTGTTGTTATAT-AACTACTACTTTTG-----
B. rossi         G--TGGCGTTTCGGGATTGTCGGCTGAGTGCG-TA-AGCAACTCC-TTG-----
B. caballi       AGGTGGA--CATGGTTTACCGAGATTGCGTGTGTTT-GACAACTCCTT-CG-----
B. divergens     GTGCAGTGTGTTGCGTAGCGATTTGTTACGATAA-TGCAACTCCGCTCGTTCATCGTCT
B. major         GAGATCCAATAACTGGTTATGTCCCTAGCGGATTAGCGACTCCGTGCT-----
B. bigemina      GCGTTGC--TGTGCCTCGGCTGCCTTTTG-GTTGT-TGCAACTCCGCGC-----
B. sp.EU1        GTGCGGC--TTTGCCTGGC--TTTCCCGCAGAA-TGCAACTCCGCGG--AGCGCTT
B. microti       GTCTTCGGATGGGTTCATGCGAGCGTTTGTCTAAAC-AACAATACT---A-----
  
```

* * * * *

```

B. canis          ---ACTYT-GTCGAGTAWC--GAAATCTAACTTTTCAGCGATGGATGTCTTGGCT
B. vogeli        ---ACTGT-GTCGAGTATT--GAAATCTAACTTTTCAGCGATGGATGTCTTGGCT
B. cf. microti   -----TATATAATT-AAAAATCAAATTTTCAGCGGTGGATGTCTCGGCT
B. rossi         ---ATT-----TGAT--GAAATTTGAACTTTTCAGCGATGGATGTCTTGGCT
B. caballi       --CGTTAG-CGATTTTGTT--ATGATTTCAACTTTTCAGCGATGGATGTCTTGGCT
B. divergens     TCGTGTGTTTCGAGTTTGTGTTAGAAATTATAAACTTTTCAGCGATGGATGTCTTGGCT
B. major         -----TCGGCATAATGTATCAATTC-AACTTTTCAGCGATGGATGTCTTGGCT
B. bigemina      --TTTTGG-CGTCTTTGTA--A--ACTTTAACTTTTCAGCGATGGATGTCTTGGCT
B. sp.EU1        --CGGCGCTCTGGTTGAT--GAATCTATAAACTTTTCAGCGATGGATGTCTTGGCT
B. microti       -----TGAATATTA-AACGAAACAAATTTTCAGCGGTGGATGTCTCGGCT
  
```

** ***** ***** **

Abb. 11: Alignment zum Vergleich der ITS-1 Sequenzen verschiedener *Babesia* spp. Folgende Sequenzen werden durch die Primer (grau unterlegt) detektiert: *B. canis* (AF394533.1), *B. vogeli* (AF394534.1), *B. cf. microti* (AF510203.1), *B. rossi* (AF394535.1), *B. caballi* (AF394536.1), *B. divergens* (EU185801.1), *B. major* (HM538228.1), *B. bigemina* (HM538227.1), *B. sp. EU1* (= *B. venatorum*; HM113372.1) und *B. microti* (AB190435.1). Bezüglich *B. bovis* (KF928960.1) bestanden Inkompatibilitäten im Rückwärtsprimer.

10 Publikationsverzeichnis

Teile dieser Dissertationsschrift wurden bereits im Vorfeld auf Tagungen (Vorträge) bzw. in einem Artikel veröffentlicht.

Publikationen

Kohn, M., Krücken, J., McKay-Demeler, J., Pachnicke, S., Krieger, K. und von Samson-Himmelstjerna, G. (2019). "*Dermacentor reticulatus* in Berlin/Brandenburg (Germany): Activity patterns and associated pathogens." *Ticks Tick Borne Dis* 10(1): 191-206.

Wernike, K., Kohn, M., Conraths, F. J., Werner, D., Kameke, D., Hechinger, S., Kampen, H. und Beer, M. (2013). "Transmission of Schmallenberg virus during Winter, Germany." *Emerg Infect Dis* 19(10): 1701-1703.

Sassnau, R., Kohn, M., Demeler, J., Kohn, B., Müller, E., Krücken, J. und von Samson-Himmelstjerna, G. (2013). "Is *Dirofilaria repens* endemic in the Havelland district in Brandenburg, Germany?" *Vector Borne Zoonotic Dis* 13(12): 888-891.

Krücken, J., Schreiber, C., Maaz, D., Kohn, M., Demeler, J., Beck, S., Schein, E.[†], Olias, P., Richter, D., Matuschka, F. R., Pachnicke, S., Krieger, K., Kohn, B. und von Samson-Himmelstjerna, G. (2013). "A novel high-resolution melt PCR assay discriminates *Anaplasma phagocytophilum* and „*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*“." *J Clin Microbiol* 51(6): 1958-1961.

Kohn, M., Demeler, J., Krücken, J., Schein, E.[†], Pachnicke, S. und von Samson-Himmelstjerna, G. (2011). „Untersuchungen im Umland von Berlin: Verbreitung und Vektorkompetenz der Auwaldzecke *Dermacentor reticulatus*“. *VetMed Report* Nr.6, 35. Jahrgang, ISSN 1862-4073. S.6-7.

Wissenschaftliche Vorträge

Kohn, M., Demeler, J., Krücken, J., Schein, E.[†], Pachnicke, S., Krieger, K. und von Samson-Himmelstjerna, G. (2013). "Analysis of the distribution of *Dermacentor reticulatus* and its role as a vector for pathogens in the area of Berlin". Post-Doc Seminar, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems. 19. Februar 2013.

Publikationsverzeichnis

Kohn, M., Demeler, J., Krücken, J., Schein, E.[†], Pachnicke, S., Krieger, K. und von Samson-Himmelstjerna, G. (2012). „*Dermacentor reticulatus*: Aktivitätsmuster und Prävalenzen zu zeckenübertragenen Krankheitserregern im Berliner Umland“. In: Tagungsband zur Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten, 2.-4. Juli 2012 in Hannover - Neue Herausforderungen bei der Bekämpfung von Parasitosen bei Nutz-, Haus- und Heimtieren. Hannover. ISBN 9-783941-552180. S. 51-52.

Kohn, M., Demeler, J., Krücken, J., Schein, E.[†], Pachnicke, S., Krieger, K. und von Samson-Himmelstjerna, G. (2012). "Analysis of the distribution of *Dermacentor reticulatus* and its role as a vector for pathogens in the area of Berlin". Young Parasitologists Meeting, Heidelberg, 11.-14. März 2012.

Kohn, M., Demeler, J., Krücken, J., Schein, E.[†], Pachnicke, S., Krieger, K. und von Samson-Himmelstjerna, G. (2011). „Untersuchungen über die Verbreitung und Vektorkompetenz der Auwaldzecke *Dermacentor reticulatus* im Umland von Berlin“. In: Tagungsband zur Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten, 4.-6. Juli 2011 in Berlin - Neue Erkenntnisse zu Parasitosen bei Nutz-, Haus- und Heimtieren. Berlin. ISBN 9-783941-552104. S. 68.

Kohn, M., Demeler, J., Krücken, J., Schein, E.[†], Pachnicke, S., Krieger, K. und von Samson-Himmelstjerna, G. (2010, 2011, 2012). „Untersuchungen über die Verbreitung und Vektorkompetenz der Auwaldzecke *Dermacentor reticulatus* im Umland von Berlin“. Parasitologisches Kolloquium, Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, Freie Universität Berlin. Berlin, Sept. 2010, Juni 2011 und Juni 2012.

Posterpräsentation

21.-22. Juni 2012

Third European *Dirofilaria* Days, Parma/Italy

Sassnau, R., Kohn, M., Demeler, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Kohn, B. und Müller, E. "Is *Dirofilaria repens* endemic in the Havelland (district in the state of Brandenburg, Germany)?"

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich zunächst Herrn Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna meinen herzlichen Dank für die Bereitstellung dieses sehr interessanten Dissertationsthemas aussprechen. Ich bedanke mich für die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit sowie für die Begutachtung der Thesis. Auch möchte ich die stets wertschätzende Arbeitsatmosphäre dankend erwähnen.

Dem bereits verstorbenen Prof. Dr. Eberhardt Schein gilt mein herzlichster Dank für die mit viel Detailliebe durchgeführte Einführung in die Welt der Zecken zu Beginn meiner Doktorarbeitszeit.

Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Jürgen Krücken, der sowohl im praktischen Teil dieser Dissertation als auch bei der Vollendung des Schriftstücks mit viel Geduld meine Fragen beantwortete und immer wieder hilfreiche Anregungen bei auftretenden Problemstellungen gab. Dr. Janina McKay-Demeler PhD möchte ich für ihre konstruktive Kritik während der Praxisphase danken.

Bei den technischen Mitarbeiterinnen Sabrina Ramünke und Peggy Hoffmann-Köhler bedanke ich mich für die Einführung in die molekularbiologischen bzw. entomologischen Arbeiten. Unserer guten Seele Louise Le Bel möchte ich ebenfalls ein großes „Dankeschön“ aussprechen. Mit einem stets freundlich-französischem „Bon“ nahm sie meine bürokratischen Anfragen entgegen. Auch bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin bedanke ich mich für den stets freundlichen und kollegialen Umgang.

Ein riesiges Dankeschön widme ich all meinen Mitdoktoranden, den Paradocs. Vielen Dank, vor allem an...Denny, Cecile alias Schlunsi, Barni, JaJa, Basti, Maxi, Tini, Maja, JaFa und Sofia...für die zahlreichen unvergesslichen Momente innerhalb und außerhalb des Instituts. Auf dass sie in unseren alljährlichen Treffen lange weiterleben.

Auch bei Jane möchte ich mich an dieser Stelle für die vielen interessanten Gespräche und Momente bedanken.

Ein großes „Danke“ möchte ich natürlich meinen Eltern, meinem Bruder und Claudi sowie meiner Oma Eva zukommen lassen...auch wenn ich dies meinem geliebten Vater und meiner lieben Oma leider nicht mehr persönlich sagen kann. Stets haben sie sich für den

Fortgang meiner Doktorarbeit interessiert und mir in Phasen, in denen es auch mal stockte, immer wieder das Gefühl gegeben: „Du schaffst das!“.

Und in manchen Fällen verändert und bereichert die Doktorarbeitszeit auch das private Leben. Somit möchte ich Denny einen unendlich großen Dank aussprechen für die immerwährende Unterstützung im privaten Leben und eben auch während der Doktorarbeitsphase, die durchaus auch mal zähe Zeiten mit sich brachte. Ich freue mich über diesen Erfolg...und vielmehr noch auf die gewonnene Zeit, die wir zusammen mit unseren mittlerweile geborenen Zwillingmädels Julie und Marie verbringen können.

Auch bei der Firma Bayer Vital GmbH und Bayer Animal Health, vertreten durch Herrn Dr. Pachnicke und Herrn Dr. Krieger, möchte ich mich für die finanzielle Förderung des Projektes und für die stets freundliche Unterstützung bedanken.

12 Finanzierungsquellen/Interessenskonflikte

Die Arbeiten wurden finanziell unterstützt durch die Firma Bayer Vital GmbH und Bayer Animal Health.

Es besteht kein Interessenskonflikt durch finanzielle Unterstützung der Arbeiten.

13 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 06.05.2019

Mareen Kohn



9 783863 879846
mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-984-6