

Aus dem Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin
und der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Zeckenübertragene Infektionserreger bei Hunden im Raum
Berlin/Brandenburg: Prävalenzen und Untersuchungen zum
Infektionsrisiko**

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

vorgelegt von
Cécile Schreiber
Tierärztin aus Olpe

Berlin 2013
Journal-Nr.: 3649

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Barbara Kohn
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Georg von Samson- Himmelstjerna
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar Wieler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

ticks, tickborne diseases, infectious diseases, risk analysis, Borrelia, Anaplasma phagocytophilum, Neoehrlichia mikurensis, Rickettsia, Babesia, dogs, polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 28.11.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-408-7

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

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 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Sheila

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	ZECKEN.....	2
2.2	UNTERSUCHTE ZECKENSPEZIES	2
2.2.1	<i>IXODES RICINUS</i>	3
2.2.1.1	Morphologie und Entwicklung.....	3
2.2.1.2	Habitat und Saisonalität.....	4
2.2.2	<i>IXODES HEXAGONUS</i>	4
2.2.2.1	Morphologie und Entwicklung.....	4
2.2.2.2	Habitat und Saisonalität.....	5
2.2.3	<i>DERMACENTOR RETICULATUS</i>	5
2.2.3.1	Morphologie und Entwicklung.....	5
2.2.3.2	Habitat und Saisonalität.....	6
2.3	ZECKENPROPHYLAXE.....	6
2.4	ZECKENÜBERTRAGENE ERREGER	7
2.5	UNTERSUCHTE ERREGER.....	11
2.5.1	PIROPLASMIDA.....	11
2.5.1.1	Systematik und Morphologie.....	11
2.5.1.2	Vektoren und Übertragung.....	11
2.5.1.3	Babesien als Krankheitserreger des Menschen	12
2.5.1.4	Canine Babesiose	13
2.5.1.5	Prävalenzen in Zecken	15
2.5.2	<i>RICKETTSIA</i> SPP.	15
2.5.2.1	Systematik.....	15
2.5.2.2	Vektoren und Übertragung.....	16
2.5.2.3	Fleckfieber-Rickettsiosen.....	16
2.5.2.4	Hunde als Reservoir von Rickettsiose-Erregern des Menschen.....	17
2.5.2.5	Prävalenzen in Zecken	17
2.5.3	ANAPLASMATACEAE.....	18
2.5.3.1	Systematik und Morphologie.....	18
2.5.3.2	Vektoren und Übertragung.....	18
2.5.3.3	<i>Anaplasma</i> spp. als Krankheitserreger	18
2.5.3.4	Canine granulozytäre Anaplasrose.....	19
2.5.3.5	<i>Candidatus Neoehrlichia</i> spp. als Krankheitserreger	19
2.5.3.6	<i>Ehrlichia</i> spp. als Krankheitserreger.....	20
2.5.3.7	Prävalenzen in Zecken	21
2.5.4	<i>BORRELIA</i> SPP.	22
2.5.4.1	Systematik und Morphologie.....	22
2.5.4.2	Vektoren und Übertragung.....	22
2.5.4.3	Borrelien als Krankheitserreger	22
2.5.4.4	Borreliose des Hundes	23
2.5.4.5	Prävalenzen in Zecken	24
2.6	WEITERE WICHTIGE ZECKENÜBERTRAGENE ERKRANKUNGEN IN MITTELEUROPA	24
2.6.1	FRÜHSOMMERMENINGOENZEPHALITIS	24
2.6.2	BARTONELLOSE	24
2.6.3	TULARÄMIE	25
2.6.4	Q-FIEBER	25
2.7	ABSCHÄTZUNG DES INFektionsRISIKOS	26
2.7.1	ÜBERTRAGUNGSZEITEN VERSCHIEDENER ERREGER.....	26
2.7.2	ABSCHÄTZUNG DER SAUGDAUER AUS DEM SCUTAL INDEX	26

3	MATERIAL UND METHODEN	28
3.1	MATERIAL	28
3.1.1	REAKTIONSKITS, MIKROORGANISMEN UND MEDIEN	28
3.1.2	ENZYME, PUFFER, LÖSUNGEN UND REAGENZIE	28
3.1.3	HERSTELLUNG VON MEDIEN UND PUFFERN	30
3.1.4	VERWENDETE PRIMER UND SONDEN	31
3.1.5	VERBRAUCHSMATERIALIEN	31
3.1.6	GERÄTE	32
3.1.7	SOFTWARE	34
3.1.8	BIOLOGISCHES MATERIAL	35
3.2	METHODEN	36
3.2.1	MESSUNG DES SCUTAL INDEX	36
3.2.2	DNA-ISOLATION	36
3.2.2.1	DNA-Isolation mittels NucleoSpin®	36
3.2.2.2	DNA-Isolation mittels Maxwell® 16	37
3.2.2.3	Bestimmung des DNA-Gehalts mittels Take 3 Platte im Synergy 4	38
3.2.3	ERREGERNACHWEISE	38
3.2.3.1	Klonierung von DNA für die Herstellung von Positivkontrollen	39
3.2.3.2	Plasmidisolierung	41
3.2.3.3	PCR-Untersuchung auf <i>Babesia</i> spp. mittels konventioneller PCR	42
3.2.3.4	PCR-Untersuchung auf <i>Rickettsia</i> spp. mittels konventioneller PCR	43
3.2.3.5	Untersuchung auf <i>Rickettsia</i> spp. mittels HRM Analyse	44
3.2.3.6	Untersuchung auf <i>Rickettsia</i> spp. mittels Sonden-HRM Analyse	45
3.2.3.7	PCR-Untersuchung auf Anaplasmataceae mittels konventioneller PCR	45
3.2.3.8	Untersuchung auf Anaplasmataceae mittels HRM Analyse	46
3.2.3.9	PCR-Untersuchung auf <i>Borrelia</i> spp. mittels konventioneller PCR	46
3.2.3.10	Agarosegelelektrophorese	48
3.2.3.11	Aufreinigung von PCR-Produkten	48
3.2.3.12	Sequenzierung	49
3.2.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG	49
3.2.5	PHYLOGENETISCHE AUSWERTUNG	50
4	ERGEBNISSE	51
4.1	BERECHNUNGEN ZUM SCUTAL INDEX	51
4.1.1	DAUER DER BLUTMAHLZEIT	51
4.1.2	UNTERSCHIEDE BEZÜGLICH SPEZIES UND GESCHLECHT DER ZECKEN	52
4.1.3	EINFLUSS DER FELLÄNGE DER HUNDE AUF DEN SCUTAL INDEX DER ZECKEN	52
4.2	PRÄVALENZEN	54
4.2.1	<i>BABESIA</i> SPP.	54
4.2.2	<i>RICKETTSIA</i> SPP.	54
4.2.3	<i>ANAPLASMA</i> SPP.	55
4.2.4	<i>BORRELIA</i> SPP.	57
4.2.5	KOINFEKTIONEN	58
4.2.5.1	<i>I. ricinus</i>	58
4.2.5.2	<i>I. hexagonus</i>	59
4.2.5.3	<i>D. reticulatus</i>	60
4.3	BERECHNETE ZUSAMMENHÄNGE BEZÜGLICH DER INFektion EINER ZECKE	61
4.3.1	KOINFEKTIONEN BEI <i>I. RICINUS</i> UND <i>I. HEXAGONUS</i>	61
4.3.2	DURCH ZECKEN ODER HUNDE BEEINFLUSSTE FAKTOREN	62
4.3.2.1	Durch Zecken beeinflusste Faktoren	62
4.3.2.2	Durch Zecken und Hunde beeinflusste Faktoren	62

4.3.3	ANZAHL DER FÜR JEDEN HUND ABGEGEBENEN INFIZIERTEN ZECKEN.....	63
4.3.4	ZUSAMMENHANG VON SCUTAL INDEX UND INFEKTION	64
4.3.5	SAISONALE UNTERSCHIEDE.....	66
4.3.5.1	Scutal Index.....	66
4.3.5.2	Infektionserreger in <i>I. ricinus</i>	68
4.3.5.3	Infektionserreger in <i>I. hexagonus</i>	70
4.3.5.4	Infektionserreger in <i>D. reticulatus</i>	72
4.3.5.5	Zeckenbefall.....	73
5	<u>DISKUSSION</u>	<u>75</u>
5.1	SCUTAL INDEX.....	75
5.2	VOR- UND NACHTEILE ANGEWENDETER PCR-DIAGNOSTIKMETHODEN.....	77
5.3	INFEKTIONSRATEN.....	78
5.3.1	PRÄVALENZEN VON <i>BABESIA</i> SPP.	82
5.3.2	PRÄVALENZEN VON <i>RICKETTSIA</i> SPP.	82
5.3.3	PRÄVALENZEN VON ANAPLASMATACEAE	83
5.3.4	PRÄVALENZEN VON <i>BORRELIA</i> SPP.	83
5.3.5	KOINFEKTIONEN	84
5.4	SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	84
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	<u>87</u>
7	<u>SUMMARY</u>	<u>89</u>
8	<u>ANHANG</u>	<u>91</u>
8.1	ABKÜRZUNGEN	91
8.2	LITERATURVERZEICHNIS.....	93
8.3	TABELLENVERZEICHNIS	124
8.4	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	125
8.5	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	127
8.6	DANKSAGUNG.....	128
8.7	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	129

1 Einleitung

Viele Zeckenarten sind potentielle Vektoren verschiedener für den Hund pathogener Infektionserreger. In Deutschland weit verbreitete Zeckenarten sind *Ixodes ricinus*, *Ixodes hexagonus* und *Dermacentor reticulatus*. Sie gehören zur Familie der Schildzecken. Bevorzugte Wirte sind vor allem kleine bis mittelgroße Säuger, Hunde mit eingeschlossen. Sie können während der Blutmahlzeit unter anderem Infektionserreger wie *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Borrelia* spp. und *Rickettsia* spp. übertragen. Alle diese Erreger sind für Hunde potentiell pathogen, führen teils zu lebensbedrohlichen Erkrankungen und können durch ihr zoonotisches Potential auch den Menschen beeinflussen.

Zur Beurteilung des Gefährdungspotentials durch zeckenübertragene Erreger in bestimmten Regionen müssen unterschiedliche Parameter berücksichtigt werden. Dazu zählt nicht nur das Vorkommen von relevanten Zeckenspezies in einer Region, auch die Prävalenz von pathogenen Erregern in diesen Zecken gibt maßgeblichen Aufschluss über das Risiko von Wirtstieren zu erkranken. Um das Gefährdungspotential eines Erregers abzuschätzen, sollte außerdem die Seroprävalenz in Wirtstieren mit der Anzahl der klinischen Erkrankungen durch diesen Erreger verglichen werden.

Eine individuelle Risikoanalyse kann über den Scutal Index (SI) in Verbindung mit dem Infektionsstatus einer Zecke erstellt werden. Der SI lässt sich aus den Körpermaßen einer Zecke ermitteln, indem die Länge des Körpers beginnend an der Basis Capituli zur Breite des Scutum ins Verhältnis gesetzt wird (Falco et al., 1996). Der SI erlaubt eine Aussage über die Dauer des Saugaktes einer Zecke. Mit zunehmender Dauer des Saugaktes erhöht sich auch der SI und das Risiko einer Infektion des Wirtstieres durch Erreger, die die Zecke in sich trägt. Aus vorhergehenden Untersuchungen ist näherungsweise bekannt, wie lange der Saugakt angedauert haben muss, damit ein bestimmter SI erreicht wird (Kahl et al., 1998; des Vignes et al., 2001; Heile et al., 2007). Für die einzelnen Erreger ist außerdem von unterschiedlichen minimalen Übertragungszeiten auszugehen.

Bislang gibt es wenige Studien zur Häufigkeit von Erregern in Zecken, die von Hunden abgesammelt wurden. Wirtsassoziierte Zecken können via Blutmahlzeit am Hund aufgenommene Erreger enthalten. Diese können später in der aus einer Zecke isolierten DNA detektiert werden, allerdings auch ohne dass notwendigerweise eine Vektorfunktion der jeweiligen Zeckenart für den untersuchten Erreger besteht.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, Erregerprävalenzen in von Berliner Hunden abgesammelten Zecken zu erheben. Untersucht wurde auf Infektionen und Koinfektionen mit *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., Anaplasmataceae und *Borrelia* spp. Zusätzlich sollte über den Zusammenhang des SI der Zecken mit der Dauer der Blutmahlzeit eine Einschätzung der Wahrscheinlichkeit einer Erregerübertragung auf die an der Studie teilnehmenden Hunde gegeben werden. Weiterhin kann der SI als Überprüfung einer erfolgreichen Zeckenkontrolle durch Hundebesitzer in Bezug auf das Absuchen nach Zecken dienen.

2 Literaturübersicht

2.1 Zecken

Zecken sind obligat blutsaugende Ektoparasiten verschiedener Wirbeltiere (Camicas et al., 1998). Weltweit existieren ca. 900 Zeckenarten. Funde von fossilen Zecken in Bernstein belegen, dass sie schon vor ca. 50 Millionen Jahren, zu einer Zeit, als sich Säugetiere erst entwickelten, nahezu den heutigen Stand ihrer Evolution erreicht hatten (Weitschat, 2004). Zecken (Ixodida) werden heute eingeteilt in die Schildzecken (Ixodidae), die Lederzecken (Argasidae), und die Nuttalliellidae als dritte Familie, die mit nur einer Art vertreten ist (Stanek, 2009).

2.2 Untersuchte Zeckenspezies

Die für diese Arbeit relevanten Zeckenspezies (Tab. 1) gehören der Familie der Schildzecken an. Diese lässt sich weiter unterteilen in die Unterfamilien Amblyomminae, Bothriocrotoninae, Haemaphysalinae, Hyalomminae, Ixodinae und Rhipicephalinae. Im Folgenden wird auf Vertreter der beiden letztgenannten Unterfamilien eingegangen, da ihnen verschiedene Zeckenspezies zugeordnet werden, die an mitteleuropäischen Hunden parasitieren. Dazu zählen *Ixodes ricinus*, *Ixodes hexagonus*, *Dermacentor reticulatus*, *Dermacentor marginatus* sowie *Rhipicephalus sanguineus* (Parola und Raoult, 2001). Die beiden letztgenannten hatten an der durchgeführten Studie keinen bzw. keinen nennenswerten Anteil und werden deshalb nicht weiter behandelt.

Tab. 1: Die drei in der Studie behandelten Zeckenspezies und ihre taxonomische Einordnung nach NCBI-Schlüssel

Überfamilie	Familie	Unterfamilie	Spezies
Ixodida	Ixodidae	Ixodinae	<i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes hexagonus</i>
		Rhipicephalinae	<i>Dermacentor reticulatus</i>
		Amblyommimae Bothriocrotoninae Haemaphysalinae Hyalomminae	
	Argasidae	Argasinae Ornithodorinae	
	Nuttalliellidae	Nuttalliellidae	

Ixodes ricinus

2.2.1.1 Morphologie und Entwicklung

I. ricinus, der gemeine Holzbock, weist dorsal ein sklerotisiertes Rückenschild, das Skutum, auf. Dieses Merkmal ist allen Mitgliedern der Familie Ixodidae gemein. Das Skutum bedeckt bei den männlichen Zecken dieser Familie den gesamten Rücken und bei weiblichen Zecken nur einen Teil der Dorsalfläche des Körpers. Der verbleibende Teil des Zeckenkörpers ist in der Lage, sich während der Blutmahlzeit auszudehnen. Daher kann sich der Körper auf das Doppelte (immature Stadien) bis das dreifache (adulte Weibchen) Ausmaß vergrößern (Sonenshine, 1991). Adulte Stadien sowie das Nymphenstadium weisen vier Beinpaare auf, während das larvale Stadium nur drei Beinpaare besitzt. Die verschiedenen Zeckenstadien unterscheiden sich weiterhin in ihrer Größe und in ihrem Wirtsschema. Adulte *Ixodes* spp. erreichen im ungesogenen Zustand eine Größe von 3-4 mm, gesogene Weibchen werden bis zu 3 cm groß. Larven mit einer Größe von 0,5 mm und Nymphen mit einer Größe von 1-2 mm sind weitaus kleiner (Parola und Raoult, 2001). Während Larven vor allem an Kleinsäugetern und teils auch Vögeln parasitieren, befallen Nymphen und Adulte auch größere Säuger und den Menschen (Hillyard, 1996). *Ixodes* spp. besitzen keine Augen. Die Orientierung zur Wirtsfindung wird durch ein anderes Sinnesorgan übernommen, das sogenannte Hallersche Organ. Dieses sitzt am dorsalen Teil des Tarsus am ersten Beinpaar. Gustatorische und olfaktorische Sinneszellen dieses Organs erleichtern die Wirtsfindung und Kommunikation mit anderen Zecken (Parola und Raoult, 2001). Während der Wirtssuche klettert *I. ricinus* auf erhöhte Punkte der Vegetation, um Kontakt zu vorbeiziehenden Wirtstieren herzustellen (Randolph, 1998). Dabei wird eine Höhe von max. 80 cm vom Erdboden nicht überschritten. Für *I. ricinus*, wie auch für alle anderen Mitglieder der Familie der Schildzecken, würde die Gefahr der Austrocknung sonst zu groß (Stanek, 2005). Ixodide Zecken reagieren auf bestimmte Stimuli, die von ihren Wirten ausgesendet werden. Dazu zählen chemische Stimuli wie CO₂, NH₃, Feuchtigkeit, Phenole und andere aromatische Chemikalien, aber auch Vibrationen und Körperwärme (Parola und Raoult, 2001). Vor der Blutmahlzeit findet eine teils mehrere Stunden andauernde Wanderung auf dem Wirtstier statt, um eine passende Einstichstelle zu finden. Nach dem Einstich werden zementartige Substanzen zur Fixation der Mundwerkzeuge der Zecke in die Haut des Wirtes abgesondert. Weiterhin werden Enzyme, Vasodilatoren, antiinflammatorische, antihaemostatische, anästhetische sowie immunsuppressive Substanzen in die oberen Hautschichten des Wirtes abgesondert. Diese Mechanismen erleichtern der Zecke die Blutmahlzeit. Die Blutmahlzeit dauert 2-15 Tage an (Parola und Raoult, 2001).

Die Entwicklung von *I. ricinus* dauert zwei bis sechs Jahre, es handelt sich um eine dreiwirtige Zecke, d.h. die Stadien Larve, Nymphe und Adulte befallen zur Blutmahlzeit unterschiedliche Wirte. Um von einer Larve zur Nymphe und von dieser wiederum zur adulten Zecke zu werden, findet je eine Häutung statt. Zur Paarung kommt es in der Regel auf dem Wirtstier und die Dauer der Entwicklung ist vom Wirtsangebot sowie den herrschenden Umweltbedingungen abhängig (Parola und Raoult, 2001).



Abb. 1: *I. ricinus*, adult, weiblich. Aufnahme Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, Freie Universität Berlin.

2.2.1.2 Habitat und Saisonalität

I. ricinus bevorzugt als Lebensraum feuchte Mikrohabitate mit einer minimalen Luftfeuchtigkeit von 85 %. Deshalb ist sie besonders in Mittel- und Nordeuropa anzutreffen und wird aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber Austrocknung nicht in mediterranen Gegenden beobachtet. Außerdem hält sich der Holzbock bevorzugt in bewaldeten Gebieten auf. Die Eignung des Habitats ist zudem abhängig von der Dichte an kleinen und größeren Wildtieren, Menschen und Hunden, die als Wirte dienen (Capelli et al., 2012). War das Vorkommen von *I. ricinus* 1965 noch auf Gegenden unter 700 m über dem Meeresspiegel beschränkt, ist heute eine Veränderung der Habitate auf bis zu über 1100 m über dem Meeresspiegel zu beobachten (Daniel et al., 2003).

Die jahreszeitliche Hauptaktivität von *I. ricinus* ist im April und Mai. Während der trockenen Sommermonate sinkt sie, um im September wieder anzusteigen (Beichel et al., 1996). Der gemeine Holzbock besitzt neben *Ixodes scapularis* eines der größten Wirtsspektren in der Familie der Schildzecken, es werden über 300 Tierspezies, darunter Säuger, Vögel und Reptilien befallen (Sonenshine, 1991; Sonenshine, 1993; Hillyard, 1996). Außerdem ist *I. ricinus* in Europa die Zeckenart, die am häufigsten den Menschen befällt (Gern, 2005).

2.2.2 ***Ixodes hexagonus***

2.2.2.1 Morphologie und Entwicklung

In der Morphologie und Entwicklung sind sich *I. ricinus* und *I. hexagonus* sehr ähnlich. Die Größe der Adulten beträgt wie bei *I. ricinus* 3-4 mm (Deplazes et al., 2013). Der Name dieser Zecke leitet sich von der Form des Scutum ab, welches bei *I. hexagonus* sechseckig ist.

I. hexagonus, die Igelzecke (Abb. 2), befällt als dreiwirtige Zecke neben dem Hauptwirt Igel auch Füchse, Wiesel, Marder, Dachse und gelegentlich den Menschen (Liebisch und Walter, 1986; Matuschka et al., 1990). Hunde und Katzen werden ebenfalls befallen (Ogden et al., 2000). Dies wird meist beobachtet, nachdem diese Kontakt zu Igelnestern hatten (Deplazes et al., 2013).



Abb. 2: *I. hexagonus*, adult, weiblich (André Karwath, Wikimedia Commons, lizenziert unter CreativeCommons-Lizenz BY-SA 2.5, URL: <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.5/deed.de>)

2.2.2.2 Habitat und Saisonalität

I. hexagonus lebt in der Behausung ihres jeweiligen Wirtes. Das Wirtstier wird nach der Blutmahlzeit, meist während es schläft, verlassen, um sich in dessen Behausung einzunisten (Matuschka et al., 1990). Bedingt durch die Nestwärme ist *I. hexagonus* ganzjährig aktiv (Beichel et al., 1996), starke Aktivität wird im Frühjahr und Herbst beobachtet (Deplazes et al., 2013).

2.2.3 ***Dermacentor reticulatus***

2.2.3.1 Morphologie und Entwicklung

D. reticulatus, die Buntzecke, unterscheidet sich von *Ixodes* spp. durch das weiß-braun marmorierte Rückenschild, die kompaktere Form und die Körpergröße. Diese ist mit etwa 5 mm bei nüchternen Weibchen deutlich größer als bei *Ixodes* spp. (Barutzki et al., 2007). Auch *D. reticulatus* ist eine dreiwirtige Zeckenart, ihr Entwicklungszyklus dauert ein bis zwei Jahre (Deplazes et al., 2013). Wie bei *Ixodes* spp. legen weibliche Zecken Eier und sterben kurz darauf. Aus den ca. 4000 Eiern schlüpfen sechsbeinige Larven, die über zwei bis drei Tage an einem geeigneten Wirt parasitieren. Danach findet die Häutung in eine achtbeinige Nymphe statt, bevor eine erneute vier- bis sechstägige Blutmahlzeit stattfindet. Es folgt die Häutung zum ebenfalls achtbeinigen adulten Stadium. Nach einer weiteren Blutmahlzeit über sieben bis 14 Tage und der Paarung legen weibliche adulte Zecken ihre Eier ab. Larven und Nymphen parasitieren an Kleinsäugetern, seltener an Vögeln (Deplazes et al., 2013). Adulte Formen hingegen befallen größere Säugetiere und auch den Menschen (Estrada-Pena und Jongejan, 1999).



Abb. 3: *D. reticulatus*, adult, weiblich (Aufnahme Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, Freie Universität Berlin)

2.2.3.2 Habitat und Saisonalität

D. reticulatus bevorzugt feuchte Wald- und Wiesengebiete als Habitat; dies sind oft brach liegende, vormals landwirtschaftlich genutzte Flächen (Deplazes et al., 2013). Bis in die fünfziger Jahre galt *D. reticulatus* in Deutschland als nicht autochthon. Die Südschweiz, Norditalien, Frankreich, Südösterreich und Slowenien galten als hauptsächliche Verbreitungsgebiete (Heile et al., 2006). Im Laufe der letzten 50 Jahre hat sich das Verbreitungsgebiet der Buntzecke nach Norden vergrößert. Heute wird die Buntzecke auch in den Niederlanden und Belgien angetroffen (Nijhof et al., 2007; Cochez et al., 2012). Nach Osten hin zieht sich ihr Verbreitungsgebiet bis nach Zentralasien und die nördliche Grenze liegt auf der Höhe von St. Petersburg (Gray et al., 2009). In Deutschland ist *D. reticulatus* mittlerweile in Bayern, Hessen, dem Saarland, Berlin und Brandenburg autochthon (Dautel et al., 2006; Beelitz et al., 2012).

Adulte Buntzecken weisen ein jahreszeitlich bimodales Aktivitätsmuster auf. Sie sind im Frühjahr von Februar/März bis Mai/Juni und im Herbst von August/September bis November/Dezember aktiv. Die Überwinterung findet unter der Moosschicht statt; die Zecke verfällt dabei in eine Art Kältestarre. Auch während der trockenen Sommermonate lässt die Aktivität nach, *D. reticulatus* zieht sich in die feuchte Erdschicht zurück (Barutzki et al., 2007).

2.3 Zeckenprophylaxe

Da Zecken Vektoren verschiedener Pathogene sind, ist die Prophylaxe gegen Zeckenbefall wichtig. Die Prophylaxe kann auf unterschiedliche Art und Weise durchgeführt werden. Neben der Verwendung von Akariziden ist das regelmäßige Absuchen der Hunde nach Zecken angezeigt. Wirkstoffe, die zur Zeckenprophylaxe dienen, lassen sich in folgende Gruppen unterteilen: Organophosphate, Carbamate, Formamidine, Pyrethroide und Phenylpyrazole.

Organophosphate schalten die Acetylcholinesterase aus, es kommt zu einer postsynaptischen Stimulation und Parasiten zeigen vor Todeseintritt eine Hyperaktivität. Bekannte Vertreter sind Diazinon und Fenthion, die gegen Insekten, Zecken und Milben

wirken (Beugnet und Franc, 2012). Diazinon ist in vielen Halsbändern mit akarizider Wirkung enthalten.

Carbamate wirken als Inhibitor der Acetylcholinesterase und hemmen damit die neuromuskuläre Erregungsleitung im Parasiten (Frey und Löscher, 2009). Sie sind wirksam gegen Flöhe und Zecken. Propoxur ist der bekannteste Vertreter dieser Gruppe und wird u.a. in Form von Halsbändern, Sprays, Shampoos und Pudern dargereicht (z.B. Bolfo[®]).

Formamidine bewirken eine Aktivierung der Adenylatcyclase an alpha-adrenergen G-Proteingekoppelten Rezeptoren, die mit einer Verhaltensänderung der Akariden einhergeht, die Zecken fallen von ihrem Wirt ab bzw. unterlassen die Blutmahlzeit. Desweiteren ist die Reproduktion der Ektoparasiten beeinträchtigt. Der bekannteste Vertreter ist Amitraz welches u.a. in Form von Halsbändern angeboten wird (Estrada-Pena und Ascher, 1999).

Pyrethroide öffnen Natriumkanäle der Nervenzellen im Parasiten und führen zu einem Natrium-Einstrom und damit einer Hyperexzitation der Nervenzellen. Diese führt zum „Knock-Down“-Effekt der Parasiten, die bewegungslos werden (Beugnet und Franc, 2012). In niedrigen Dosierungen besitzen Pyrethroide eine repellierende Wirkung (Löscher et al., 2006). Bekannte Vertreter sind Permethrin und Deltamethrin, die insektizide und akarizide Wirkung haben, sowie Flumethrin mit einer hauptsächlich akariziden Wirkung. Sie werden u.a. in Form von Pudern, Halsbändern (z. B. Klitix[®]) oder Spot-Ons (z.B. Advantix[®], ExSpot[®]) appliziert.

Wichtige Vertreter der Phenylpyrazole sind Fipronil und Pyriprol. Sie setzen sich an Gammaaminobuttersäure- und Glutamatrezeptoren, blockieren den Einstrom von Chloridionen in die Nervenzelle und führen dadurch zu neuronaler Hyperaktivität im Parasiten (Beugnet und Franc, 2012). Phenylpyrazole sind als Spot-Ons (z.B. Frontline[®], Prac-tic[®]) oder Sprays verfügbar.

An dieser Studie teilnehmende Hunde wurden ebenfalls mit nicht laut Arzneimittelgesetz zur Prophylaxe gegen Zeckenbefall anerkannten Mitteln behandelt. Unter anderem wurden die Hunde mit Teebaumöl, Zitronenminze und Niembaumöl behandelt, sowie mit Knoblauch gefüttert. Die repellierende Wirkung dieser Substanzen auf Zecken ist unsicher, sodass kein zufriedenstellender Zeckenschutz mit ihnen erreicht werden kann (Löscher et al., 2006).

2.4 Zeckenübertragene Erreger

Heute gibt es mehr zeckenübertragene Erreger in Mitteleuropa als noch vor einigen Jahren. Viele Faktoren tragen dazu bei. Die Klimaerwärmung und das damit verbundene Ausbleiben langer harter Winter wird dabei als wichtiger Punkt diskutiert (Gray et al., 2009). Auch die Renaturierung landwirtschaftlicher Nutzflächen, Natur- und Artenschutz können die Wirtspopulationen einheimischer Zecken und damit das Vorkommen von zeckenübertragenen Erregern fördern. Sport-, Heim- und Nutztiertransporte über teils mehrere Ländergrenzen hinweg tragen zur Verbreitung zeckenübertragener Erreger bei. Beispielsweise fahren viele Nord- und Mitteleuropäer während der Sommermonate mit ihren Haustieren nach Italien, Spanien oder Frankreich und führen dadurch Infektionserreger, die vor allem in Südeuropa endemisch sind, auch nach Nordeuropa ein (Beugnet und Marie, 2009). Doch auch der organisierte Import von Tieren aus dem mediterranen Raum ruft eine weitere Verbreitung von zeckenübertragenen Krankheitserregern hervor (Irwin, 2009).

Zecken als obligat haematophage Lebewesen eignen sich besonders gut zur Übertragung von Infektionserregern (Stanek, 2005). Im Zeckenspeichel sind immunsuppressiv wirksame Substanzen enthalten. Diese erleichtern die systemische Infektion der Wirte (Juncadella und Anguita, 2009). Auch die Infektion von weiteren, zur gleichen Zeit am Hund parasitierenden Zecken ist möglich (Labuda et al., 1997). Die Übertragung von Erregern durch ein

Zeckenstadium zwischen mehreren Wirtstieren ist nicht der maßgebliche Faktor zur Verbreitung von Erregern. Die wichtigste Rolle spielt vielmehr die transstadiale sowie bei einigen Pathogenen auch die transovarische Übertragung (Parola und Raoult, 2001). Eine Übersicht der in Europa relevanten Infektionserreger zeigt die wichtigsten zeckenübertragenen Erreger (Tab. 2) mit den damit verbundenen Krankheitsbildern.

Tab. 1: In Europa relevante Infektionserreger, die durch *I. ricinus*, *I. hexagonus* und *D. reticulatus* übertragen werden, verursachte Erkrankungen sowie Übertragungsmodi, mit * markierte Erreger sind hundepathogen.

Zeckenspezies	Erregerart	Literaturquelle	Erkrankung	Übertragungsmodus transstadial/ transovariell
<i>I. ricinus</i>	<i>Babesia</i> spp. *	(Mehlhorn und Schein, 1984)	Babesiose	+/+
	<i>Rickettsia</i> spp. *	(Raoult und Roux, 1997)	Rickettsiose	+/+
	FSME-Virus*	(Estrada-Pena und Jongejan, 1999)	FSME (Frühsommer-Meningoencephalitis)	+/+
	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> *	(Rikihisa, 1991)	Anaplasmosen	+/+
	<i>Candidatus</i> Neoehrlichia mikurensis*	(Jahfari et al., 2012)	„Neoehrlichiose“	fraglich
	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato*	(Postic et al., 1994)	Lyme-Borreliose	+/-
	<i>Borrelia miyamotoi</i>	(Scoles et al., 2001)	Rückfallfieber	+/+
	<i>Francisella tularensis</i> *	(Parola und Raoult, 2001)	Tularämie	+/+
<i>I. hexagonus</i>	<i>Bartonella</i> spp.*	(Schouls et al., 1999)	Bartonellose	+/-
	<i>Babesia</i> spp. *	(Mehlhorn und Schein, 1984)	Babesiose	+/+
	<i>Rickettsia</i> spp. *	(Raoult und Roux, 1997)	Rickettsiose	+/+
	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> *	(Nijhof et al., 2007)	Anaplasmosen	+/+
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato*	(Toutoungi und Gern, 1993)	Lyme-Borreliose	+/-	

Literaturübersicht

<i>D. reticulatus</i>	<i>Babesia</i> spp. *	(Mehlhorn und Schein, 1984)	Babesiose	+/+
	<i>Rickettsia</i> spp. *	(Raoult und Roux, 1997)	Rickettsiose	+/+
	<i>Coxiella burnetii</i>	(Parola und Raoult, 2001)	Q-Fieber	+/+
	<i>Francisella tularensis</i> *	(Parola und Raoult, 2001)	Tularämie	+/+

2.5 Untersuchte Erreger

Im Folgenden soll auf die in dieser Studie untersuchten Erreger eingegangen werden. Bei der Planung der Untersuchungen wurde, ausgehend von bereits veröffentlichten Studien, ein Spektrum von vier Erregergruppen gewählt, die in Deutschland endemisch sind. Dazu gehören *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp. und *Borrelia* spp., da deren Bedeutung durch vermutete hohe Prävalenzen als besonders groß angenommen wurde. *Babesia* spp. wurden ebenfalls untersucht, da sie über ein hohes pathogenes Potential verfügen.

2.5.1 Piroplasmida

2.5.1.1 Systematik und Morphologie

Zur Gruppe der Piroplasmida im Stamm der Apicomplexa gehören *Babesia* spp. sowie *Theileria* spp.. Protozoen des Genus *Babesia* sind intraerythrozytäre Parasiten, die ein großes Wirtsspektrum besitzen und weltweit vorkommen. Es sind über 100 *Babesia* spp. bekannt (Spielman et al., 1985). Sie sind obligat heteroxen, denn *Babesia* spp. sind sowohl auf Wirbeltiere als auch auf ixodide Zecken angewiesen, um ihren Entwicklungszyklus durchlaufen zu können (Homer et al., 2000). Aufgrund ihrer charakteristischen birnenförmigen Morphologie werden sie der Ordnung der Piroplasmida zugesprochen. Anhand der Morphologie ihrer Merozoiten werden *Babesia* spp. in große (3-5 µm) und kleine (1-3 µm) Babesien eingeteilt (Mehlhorn und Schein, 1984).

Theileria spp. sind parasitäre Protozoen, die als Krankheitserreger bei Rind und Pferd bekannt sind und weltweit in tropischen und subtropischen Gebieten endemisch sind (Englund und Pringle, 2003; Morrison und McKeever, 2006). Sie werden unter anderem dadurch von *Babesia* spp. abgegrenzt, dass sie präerythrozytäre Stadien in Lymphozyten bilden (Mehlhorn und Schein, 1998).

Eine taxonomisch gesonderte Stellung im Vergleich zu anderen *Babesia* spp. und zu *Theileria* spp. kommt der *Babesia microti* Gruppe zu. Zu dieser zählen *Babesia rodhaini*, *Theileria annae*, verschiedene *Babesia microti* Isolate sowie einige Isolate von *Babesia gibsoni*. Die Einteilung in eine gesonderte Gruppe wurde durch die Untersuchung des 18S rDNA Gens der verschiedenen Erreger bestätigt (Zahler et al., 2000). In einer neueren Studie, in der das CCT η Gen als Zielbereich von Untersuchungen verwendet wurde, wird vorgeschlagen, alle *B. microti*-ähnlichen Erreger innerhalb einer neuen Gattung einzuordnen (Nakajima et al., 2009).

2.5.1.2 Vektoren und Übertragung

Vektoren für die *Babesia* spp. sind ixodide Zecken (Tab. 3). Der am längsten bekannte Erreger der caninen Babesiose ist *Babesia canis*. Für *B. canis* stellen in erster Linie Zecken der Genera *Dermacentor*, *Rhipicephalus* und *Haemaphysalis* Vektoren dar (Uilenberg et al., 1989). Doch auch *I. ricinus* kann ein Vektor sein, allerdings für andere *Babesia* spp. (Duh et al., 2001; Casati et al., 2006). Die Übertragung der Erreger auf entsprechende Wirte findet während der Blutmahlzeit infizierter Zecken statt. Dabei beträgt die notwendige minimale Übertragungszeit 48 h (Heile et al., 2007). Innerhalb einer Zeckenpopulation werden *Babesia* spp. sowohl transstadial als auch transovariell übertragen (Mehlhorn und Schein, 1984). Im Laufe des Entwicklungszyklus von *Babesia* spp. nehmen Zecken während ihrer Blutmahlzeit an infizierten Wirten Erythrozyten mit den enthaltenen Erregern in Form von Gamonten auf. Im Zeckendarm findet die sexuelle Vermehrung der Erreger statt. Diese lässt sich an der charakteristischen Bildung von sogenannten Strahlenkörpern erkennen. Die Entwicklung zu Gameten findet statt, sie fusionieren und bilden dadurch eine Zygote. Diese wird nach einiger Zeit zum motilen Kineten und erreicht über die Haemolymph der Zecke deren Speicheldrüsen. Abhängig von der *Babesia*-Spezies findet die Vermehrung in

unterschiedlichen Organen der Zecke statt (Kjemtrup und Conrad, 2000). In den Speicheldrüsen befindliche Kineten produzieren bis zu 100.000 Sporozoiten, die bei der Blutmahlzeit in den Wirt der Zecke inokuliert werden. Sobald sich die Sporozoiten im Wirt befinden, dringen sie in Erythrozyten ein. Hier findet eine asexuelle Vermehrung, die Merogonie, statt. Die dabei entstehenden Merozoiten lassen sich lichtmikroskopisch an ihrer „Paarform“ erkennen. Nach der Merogonie wird der befallene Erythrozyt zerstört, die Merozoiten werden freigesetzt und infizieren wiederum andere Erythrozyten. Je nach Zeckenart können sich unterschiedliche *Babesia*-Spezies in der Zecke vermehren.

Im Laufe der Ausbreitung von Kineten im Körper der Zecke werden auch die Eier der Zecken befallen, dadurch kann auch eine transovarielle Übertragung stattfinden (Mehlhorn und Schein, 1998).

Tab. 3: Zeckengenera der Studie und durch sie übertragene *Babesia* spp., mit * markierte Erreger sind zoonotische Erreger

Zeckengenus	<i>Babesia</i> spp.	Zwischenwirt	Literaturquelle
<i>Dermacentor</i>	<i>Babesia canis canis</i>	Hund	(Karbowski, 2004; Adaszek und Winiarczyk, 2008)
	<i>Babesia microti</i> *	Wildnager	(Wojcik-Fatla et al., 2012)
<i>Ixodes</i>	<i>Babesia venatorum</i> *	Reh	(Bonnet et al., 2007; Becker et al., 2009)
	<i>Babesia divergens</i> *	Rind	(Becker et al., 2009)
	<i>Babesia microti</i> *	Wildnager	(Casati et al., 2006; Wojcik-Fatla et al., 2012)
	<i>Babesia capreoli</i>	Gams, Steinbock	(Hoby et al., 2009; Oines et al., 2012)

2.5.1.3 Babesien als Krankheitserreger des Menschen

Seit ca. 50 Jahren ist die Babesiose als Zoonose bekannt (Kjemtrup und Conrad, 2000). *Babesia* spp. waren vorher, seit dem Jahr 1888, nur als Ursache von Fieber, hämolytischer Anämie und Hämoglobinurie bei Rindern bekannt und waren somit durch die Abnahme der Milchleistung, eine verringerte Gewichtszunahme und das Vorkommen sporadischer Todesfälle infizierter Tiere von vorrangig ökonomischer Bedeutung (Schoeman, 2009). Der erste Fall humaner Babesiose wurde 1957 im ehemaligen Jugoslawien bei einem splenektomierten Patienten durch eine Infektion mit *Babesia bigemina* dokumentiert (Skrabalo und Deanovic, 1957). Weltweit wurden bis ins Jahr 2000 ca. 300 weitere Fälle humaner Babesiose bekannt. Davon wurden 30 in Europa beobachtet, 23 davon durch Infektionen mit *Babesia divergens* (Kjemtrup und Conrad, 2000). Splenektomierte Patienten stellen eine Risikogruppe dar, ein geringerer Teil der bekannten humanen Babesiose-Fälle wurde an Menschen mit intakter Milz festgestellt (Gorenflot et al., 1998). Es wird von still verlaufender oder nur mit einer leichten Leistungsminderung einhergehender Babesiose bis hin zu fulminanten Krankheitsausbrüchen mit Todesfolge berichtet (Homer et al., 2000).

Als Hauptvertreter unter den Erregern der humanen Babesiose in Europa gilt *B. divergens*. Der Vektor ist in diesem Fall *I. ricinus* (Lewis und Young, 1980). Doch auch *Babesia bovis*, *B. microti* und *B. venatorum*, auch bekannt als *Babesia* sp. EU1 können Erreger der humanen Babesiose in Europa sein (Hildebrandt et al., 2007; Becker et al., 2009). Der letztgenannte Erreger wurde erstmals im Jahr 2003 in Europa als humanpathogener Babesioseerreger identifiziert. Er weist eine enge Verwandtschaft zu *B. divergens* auf

(Herwaldt et al., 2003; Hasle et al., 2011). Im Gegensatz zu Europa tritt in den USA *B. microti* als häufigster Erreger der humanen Babesiose auf. Diese Diskrepanz kann sich anhand der Tatsache erklären, dass *B. microti* in den USA und Europa nicht identisch sind. Es wird vermutet, dass die beiden Erreger mit unterschiedlicher Pathogenität für den Menschen einhergehen. Geographisch bedingt weisen sie außerdem unterschiedliche Vektoren auf. In den USA dient insbesondere *Ixodes scapularis* als Vektor, eine Zecke, die auch den Menschen befällt. Infektionen verlaufen klinisch inapparent bis hin zu einer grippeähnlichen Symptomatik, die nach einigen Tagen abklingt. Schwerwiegendere Verläufe sind bei splenektomierten oder anderweitig immunsupprimierten Menschen zu beobachten (Kjemtrup und Conrad, 2000). In Europa dagegen gilt als Hauptvektor *Ixodes trianguliceps*, eine Zecke, die ähnlich *I. hexagonus* in der Behausung des Wirtes (i.d.R. Wildnager) nistet und nur selten den Menschen befällt (Gray et al., 2002). Auch in *I. ricinus* wurde *B. microti* detektiert (Casati et al., 2006). Bisher ist von einem autochthonen Fall eines an *B. microti* erkrankten Menschen in Europa berichtet worden. Die deutsche Patientin litt an akuter myeloider Leukämie und war damit stark immungeschwächt. Sie wurde mit Fieber vorgestellt, parasitäre Einschlüsse der Erythrozyten konnten als *B. microti* identifiziert werden (Hildebrandt et al., 2007).

2.5.1.4 Canine Babesiose

Hundepathogene Babesien lassen sich morphologisch ebenfalls in große und kleine Babesien einteilen. Vor 30 Jahren wurde davon ausgegangen, dass sich *B. canis* als große Babesienart weiter in die Subspezies *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* und *Babesia canis rossi* unterteilt. Diese werden jeweils durch Zecken der Arten *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus sanguineus* bzw. *Haemaphysalis leachi* übertragen (Uilenberg et al., 1989). Die drei Unterarten von *B. canis* lassen sich mittels Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT) unterscheiden und weisen sowohl geographisch gesehen als auch wirtsbezogen große Unterschiede auf. *Babesia canis rossi* ist in Afrika südlich der Sahara endemisch und hat in Europa keine Bedeutung. Wichtig sind hier Infektionen von Hunden mit *B. canis canis* sowie *B. canis vogeli*. Neuere Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die drei zu *Babesia canis* zählenden Babesien nicht nur auf Subspeziesebene unterscheidbar sind, sondern eigene Spezies darstellen (Zahler et al., 1998; Carret et al., 1999; Solano-Gallego und Baneth, 2011). Zu den großen Babesien des Hundes zählt in Nordamerika neuerdings außerdem *Babesia* sp. (Coco) (Lehtinen et al., 2008).

Die kleinen Babesien des Hundes werden durch *Babesia gibsoni*, *Babesia conradae* sowie *Babesia microti*-like vertreten. Die Klassifizierung des letztgenannten Erregers ist Gegenstand einer Kontroverse, da dieser auch nahe Verwandtschaft zu *Theileria* spp. aufweist. Eine Untersuchung der 18S rDNA Sequenz ergab eine Homologie von 96,7 % zu *B. microti*. Deshalb wurde die Klassifizierung von *Babesia microti*-like als *T. annae* vorgeschlagen (Zahler et al., 2000). Eine Zuordnung der *B. microti*-ähnlichen Erreger zu einer neuen Gattung erscheint sinnvoll (Nakajima et al., 2009). Endemiegebiete von *B. gibsoni* finden sich hauptsächlich in Südostasien und Amerika, dieser Erreger tritt jedoch weltweit sporadisch auf (Yeagley et al., 2009), auch in Deutschland sind erste Infektionsfälle bei Hunden bekannt (Hartelt et al., 2007). *B. microti*-like (*T. annae*) ist in Spanien und Portugal endemisch, während *B. conradae* in Kalifornien auftritt (Zahler et al., 2000; Beck et al., 2009; Di Cicco et al., 2012).

In Europa sind an Babesiose erkrankte Hunde am häufigsten mit *B. canis canis* infiziert, autochthone Fälle wurden bereits in Frankreich (Bourdoiseau, 2006), Spanien (Caccio et al., 2002), Portugal (Cardoso et al., 2008), Italien (Solano-Gallego et al., 2008), der Schweiz (Sager et al., 2005), Norwegen (Oines et al., 2010), den Niederlanden (Matjila et al., 2005), Polen (Adaszek und Winiarczyk, 2008), Ungarn (Foldvari et al., 2005) und Kroatien (Beck et

al., 2009) beobachtet. In einer Studie des Bundesverbands praktizierender Tierärzte und der Deutschen Gesellschaft für Kleintiermedizin sind per Fragebogenaktion mittels Blutaussstrich und/oder Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diagnostizierte Fälle autochthoner Babesiose bei deutschen Hunden in den Jahren 2005-2006 erfragt worden. Dabei wurden Fälle aus dem Saarland (225 Fälle), Baden-Württemberg, Bayern, Nordrhein-Westfalen (jeweils 20 Fälle), Hessen, Sachsen, Sachsen-Anhalt (jeweils 4 Fälle), Niedersachsen, Schleswig-Holstein (jeweils 3 Fälle) und Berlin (2 Fälle) registriert (Barutzki et al., 2007). Der in Europa seltenere Erreger *B. canis vogeli* hat eine globale Bedeutung. Neben Fallberichten aus Europa (Cardoso et al., 2008), Asien (Inokuma et al., 2004) und Afrika (Matjila et al., 2004) sind Infektionen auch in Nord- und Südamerika (Birkenheuer et al., 2003; Passos et al., 2005) bekannt.

Die Schwere der Symptome und der Krankheitsverlauf der caninen Babesiose sind abhängig von der *Babesia* Spezies:

Der in Afrika endemische Erreger *B. canis rossi* geht mit akuten bis perakuten Krankheitsverläufen einher. Zentralnervöse Symptome wie epileptiforme Anfälle oder ein Multi-Organversagen resultierend aus der hämolytischen Anämie und einem hypovolämischen Schock sind sehr häufig und oft mit letalem Ausgang verbunden (Reyers et al., 1998).

Babesia canis vogeli ist Ursache moderater, oft klinisch inapparenter Infektionen adulter Hunde und geht häufig mit sehr geringer Parasitämie einher. Dies hat zur Folge, dass Infektionen mit *B. canis vogeli* oft übersehen werden (Schoeman, 2009). Welpen dagegen reagieren oft mit hochgradiger hämolytischer Anämie (Irwin und Hutchinson, 1991).

Die Symptomatik des mit *B. canis canis* infizierten Hundes ist sehr variabel. Sie beinhaltet in absteigender Häufigkeit Dehydratation, Apathie, Anorexie, Inappetenz, Fieber, Ikterus, Petechien auf Schleimhäuten, generalisierte Lymphadenomegalie und Epistaxis. Diese Symptome sind oft verbunden mit geringgradiger Parasitämie, die nicht mit dem Grad der Anämie in Verbindung steht (Furlanello et al., 2005). Insbesondere in Endemiegebieten mit hoher Seroprävalenz sind Erkrankungen selten und die Mortalität gering (Martinod et al., 1986). Im Labor lassen sich neben der Anämie Thrombozytopenie, Hämoglobinurie, Hämoglobinämie, Hyperglobulinämie, Bilirubinurie, Hyperbilirubinämie und Proteinurie feststellen (Dürbaum et al., 2000).

Infektionen mit *B. gibsoni* können durch perakuten, akuten oder chronischen Krankheitsverlauf gekennzeichnet sein, am häufigsten tritt jedoch der akute Verlauf ein. Eine direkte Übertragung durch den Biss eines infizierten Hundes ist möglich und spielt in den USA bei Kampfhunden eine wichtige Rolle (Yeagley et al., 2009). Die Symptome bei Krankheitsausbruch ähneln denen einer Infektion mit *B. canis canis*. Besonders Hunde mit chronischen Krankheitsverläufen bergen ein hohes Risikopotential durch ihren Import in nicht-endemisierte Gebiete (Schoeman, 2009).

Zur Therapie der Babesiose ist in Deutschland das Antiprotozoikum Imidocarb Dipropionat Wirkstoff der Wahl (Naucke, 2008). Dieses kann auch zur Reiseprophylaxe vor dem Besuch enzootischer Gebiete bei Hunden eingesetzt werden. Mit einer Dosis von 6 mg/kg sind Hunde ca. 4-6 Wochen gegen klinische Symptome einer *B. canis* Infektion geschützt (Löscher et al., 2006).

Durch die Impfung mit dem in der Europäischen Gemeinschaft zugelassenen Impfstoff, der inaktivierte Formen von *B. canis* und *B. rossi* enthält, wird eine Infektion nicht verhindert. Allerdings treten klinische Symptome bei Infektion gemildert auf, außerdem ist der Impfstoff in Deutschland nicht im Handel (Hartmann et al., 2007).

2.5.1.5 Prävalenzen in Zecken

In Zecken aus Europa fanden sich verschiedene *Babesia* spp., dazu gehörten insbesondere *Babesia* sp. EU1, *B. divergens*, *B. microti* und *B. canis canis*.

In der Schweiz von Tieren und Menschen gesammelte sowie aus der Natur mittels Flaggen-Methode¹ gesammelte Zecken wiesen eine Infektionsrate von unter 1 % auf. Darunter *B. microti*, *B. divergens* und *B. venatorum* (Casati et al., 2006). Die Prävalenzen in von Wildnagern abgesammelten Zecken in der Schweiz betrug dagegen 2,4 %, darunter *B. venatorum* und *B. microti* (Burri et al., 2011). In Slowenien geflaggte Zecken wiesen eine Prävalenz von 7,4 % für *Babesia* spp. auf. Darunter ließen sich die humanpathogenen Erreger *B. microti* und *B. divergens* nachweisen, sowie der eng mit letzterem verwandte Erreger *Babesia odocoilei* (Duh et al., 2001). In Polen wurde in *D. reticulatus* eine Prävalenz von 4,5 % *B. microti* ermittelt (Wojcik-Fatla et al., 2012). Auch in Norwegen fanden sich *Babesia* spp. in *I. ricinus* mit einer Infektionsrate von 0,9 %. Darunter waren *B. venatorum*, *B. divergens* und *B. capreoli* (Oines et al., 2012).

In Deutschland durchgeführte Untersuchungen ergaben *Babesia* spp.-Prävalenzen in einer Höhe von 1-4,1 %. In Leipzig geflaggte sowie von Wildnagern abgesammelte Zecken waren zu 4,1 % infiziert, mit *B. microti*, *B. capreoli* und *B. venatorum* (Silaghi et al., 2012). In Baden-Württemberg und Bayern geflaggte Zecken wiesen eine Prävalenz von ca. 1 % auf (Hartelt et al., 2008). Hier wurden *B. microti* und *B. divergens* identifiziert. Auch im Saarland wurden mittels Flaggen-Methode in ausgewählten zeckenreichen Gebieten *D. reticulatus* gesammelt und auf *Babesia* spp. untersucht. Dabei wurde eine Prävalenz von 2,5 % ermittelt. Bei dem in dieser Studie identifizierten Erreger handelte es sich um *B. canis canis*. Dies bedeutet eine erstmalig nachgewiesene Endemisierung der Babesienpezies auch in Teilen Deutschlands (Beelitz et al., 2012).

2.5.2 *Rickettsia* spp.

2.5.2.1 Systematik

Rickettsia spp. sind gramnegative, obligat intrazelluläre α -Proteobakterien, benannt nach dem Molekularbiologen Howard Taylor Ricketts. Sie gehören zur Familie der *Rickettsiaceae* und zum Genus *Rickettsia*, das sich in die Speziesgruppen der *Spotted Fever Group*, *Typhus group* und *Bellii group* einteilen lässt (Botelho-Nevers und Raoult, 2011). Dabei sind Vertreter der *Spotted Fever Group* mit über 50 Spezies besonders zahlreich. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind in Europa *Rickettsia conorii*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia monacensis*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia felis*, *Rickettsia raoulti* und *Rickettsia slovacica*, da sie Krankheitserreger für Mensch und Tier sind (Dobler und Wölfel, 2009). Zur *Typhus Group* gehören *Rickettsia typhi*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia monteiroi*, *Rickettsia canadensis* sowie *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*, wobei insbesondere die beiden erstgenannten für ihre Pathogenität beim Menschen bekannt sind. *R. typhi* und *R. prowazekii* werden ausschließlich durch Flöhe respektive Läuse übertragen und werden deshalb hier nicht weiter besprochen. Die *Bellii group* macht mit *Rickettsia bellii* die kleinste Gruppe aus, ihre Pathogenität konnte bislang nicht bewiesen werden (Labruna et al., 2007). Je nach Spezies werden diese Erreger durch unterschiedliche Vektoren übertragen.

¹ Um Zecken im Freiland zu sammeln, behilft man sich der sogenannten „Flaggen-Methode“. Dabei wird ein ca. 1×1m großes weißes Tuch durch die Vegetation gezogen und die Zecken lassen sich darauf nieder.

2.5.2.2 Vektoren und Übertragung

Vektoren und Reservoirs für *Rickettsia* spp. sind verschiedene Arthropoden. Zu ihnen zählen neben den Zecken Milben, Flöhe oder Läuse (Dobler und Wölfel, 2009). Da alle Zeckenstadien obligat haematophag sind, werden sie als Hauptvektoren für *Rickettsia* spp. der Fleckfiebergruppe angesehen. Da sich die Erreger im gesamten Körper der Zecken verbreiten, ist die Möglichkeit einer Infektion der Eier gegeben. Die transovarielle sowie die transstadiale Übertragung von *Rickettsia* spp. durch Zecken wurde nachgewiesen (Raoult und Roux, 1997). Zecken können sich neben einer transovariellen Infektion durch die Paarung oder die zeitgleiche Blutmahlzeit mit bereits infizierten Artgenossen infizieren (Philip, 1959; Hayes et al., 1980). Reservoir für *Rickettsia* spp. sind unter anderem die im Zuge dieser Studie untersuchten Zeckenspezies (Tab. 4). *Rickettsia* spp. vermehren sich durch Zweiteilung, sie parasitieren in retikuloendothelialen Zellen von Arthropoden und Vertebraten (Rolle, 2007). Im Zeckenkörper infizieren sie die Speicheldrüsen der Zecke (Raoult und Roux, 1997).

Tab. 4: Die in der Studie untersuchten Zeckengenera als Reservoir von *Rickettsia* Spezies

Zeckengenus	<i>Rickettsia</i> spp.	Literatur	
<i>Dermacentor</i>	<i>Rickettsia raoulti</i>	(Marquez, 2008)	
	<i>Rickettsia slovaca</i>	(Raoult et al., 2002)	
	<i>Rickettsia rickettsii</i> <i>Rickettsia sibirica</i> <i>Rickettsia japonica</i> <i>Rickettsia bellii</i> <i>Rickettsia montana</i> <i>Rickettsia rhipicephali</i> <i>Rickettsia peacockii</i>	(Raoult und Roux, 1997)	
	<i>Rickettsia helvetica</i>	(Christova et al., 2003)	
	<i>Ixodes</i>	<i>Rickettsia monacensis</i>	(Silaghi et al., 2008)
		<i>Rickettsia australis</i> <i>Rickettsia rickettsii</i> <i>Rickettsia japonica</i>	(Raoult und Roux, 1997)
		<i>Rickettsia felis</i>	(Gargili et al., 2012)

2.5.2.3 Fleckfieber-Rickettsiosen

Schwerwiegende, durch Zecken übertragene Rickettsiosen treten insbesondere in den USA und in Mittelmeerländern auf. Das Rocky Mountain Fleckfieber, verursacht durch *Rickettsia rickettsii*, wird durch Zecken des Genus *Dermacentor* übertragen. Die meisten Erkrankungsfälle des Menschen wurden in North Carolina, Oklahoma, Arkansas, Tennessee und Missouri erfasst (Openshaw et al., 2010). Das Boutonneuse Fieber, verursacht durch *Rickettsia conorii*, wird durch *Rhipicephalus sanguineus* übertragen. Eine Gefahr für Menschen und Hunde durch diesen Erreger ist in Südeuropa, dem Mittleren Osten, dem indischen Subkontinent und Asien gegeben (Nicholson et al., 2010). Beide Erkrankungen gehen beim Menschen mit einer ähnlichen Symptomatik einher; Fieber, Muskel- und Gelenkschmerzen, Müdigkeit, Abgeschlagenheit und makulopapuläres Exanthem zählen zu

den Hauptsymptomen, wobei es nur beim Boutonneuse Fieber zur Schorfbildung kommt. Bei inadäquater Therapie oder vorliegenden Grunderkrankungen kommt es zu Todesfällen, wobei die Letalitätssrate beim Rocky Mountain Fleckfieber mit bis zu 30 % deutlich höher ist als die beim Boutonneuse Fieber mit bis zu 10 % (Dobler und Wölfel, 2009). Mit *R. conorii* infizierte Hunde werden mit Fieber, Lethargie, Erbrechen und Anorexie vorgestellt (Solano-Gallego et al., 2006). Infektionen des Hundes mit *R. rickettsii* können neben den genannten Symptomen zu Ekchymosen, Epistaxis, neurologischen Symptomen und zum Tod führen (Keenan et al., 1977). Diese und weitere Rickettsiosen des Hundes treten in Deutschland bisher lediglich als Reisekrankheiten auf. Die Behandlung mittels der Antibiotika Chlortetracyclin, Doxycyclin, Oxytetracyclin oder Tetracyclin ist möglich.

In Deutschland endemische, durch Zecken des Genus *Dermacentor* und *Ixodes* übertragene humanpathogene *Rickettsia* spp. sind *R. helvetica*, *R. felis*, *R. monacensis* und *R. slovaca*. *R. helvetica* wird hauptsächlich von *I. ricinus* übertragen, *D. reticulatus* wurde jedoch ebenfalls als Träger beschrieben (Dobec et al., 2009). *R. helvetica* wird beim Menschen in Zusammenhang mit leichten, grippeähnlichen Symptomen ohne Bildung von Exanthenen gebracht, wurde jedoch auch als Erreger einer Meningitis nachgewiesen und mit Endokarditiden in Verbindung gebracht (Dobler und Wölfel, 2009; Nilsson et al., 2010). *R. felis*, *R. massiliae* und *R. monacensis*, übertragen durch *I. ricinus*, können Fieber und Exantheme verursachen (Richter et al., 2002; Dobler et al., 2009). Weitere Erreger, *R. slovaca* und *R. raoulti* werden durch Zecken des Genus *Dermacentor* übertragen. Sie sind Erreger von TIBOLA (tick-borne lymphadenitis), einer Erkrankung, die mit Fieber und Lymphadenopathie ohne Bildung eines Exanthems einhergeht (Parola et al., 2009; Rieg et al., 2011). Pathogenität für Hunde konnte bislang für keine der in Deutschland endemischen *Rickettsia* spp. nachgewiesen werden.

2.5.2.4 Hunde als Reservoir von Rickettsiose-Erregern des Menschen

Der Zusammenhang von mit Zecken infestierten Hunden und dem Ausbruch von Rocky Mountain Fleckfieber wurde vielfach belegt (Levy, 2004; Demma et al., 2005; Dantas-Torres et al., 2006). Doch auch im Zusammenhang mit *R. felis* wird von einer möglichen Einschleppung in menschliche Behausungen über am Hund befindliche Arthropoden berichtet (Rieg et al., 2011). Es existieren mehrere Fallberichte von gleichzeitigen Erkrankungen von Hunden und ihren Besitzern (Nicholson et al., 2010). In den USA wurde eine Studie zu mit Hundeerkrankungen assoziierten Rocky Mountain Fleckfieber Fällen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass 40 % der Patienten 5-14 Tage vor Krankheitsausbruch Zecken von ihren Hunden entfernten (Price, 1954). Neben der Ansteckung des Menschen über einen Zeckenstich können *Rickettsia* spp. über die Schleimhäute oder kleine Hautverletzungen aufgenommen werden und zu einer Infektion führen. Mangelnde Hygiene nach der Entfernung von Zecken am Hund kann somit eine Infektion des Menschen mit Rickettsien zur Folge haben (Elchos und Goddard, 2003). Eine Erkrankung des Hundes sollte daher Anlaß sein, mit diesem zusammenlebende Menschen medizinisch gut zu überwachen.

2.5.2.5 Prävalenzen in Zecken

Die Prävalenzen von *Rickettsia* spp. in Zecken wurden in vielen europäischen Ländern untersucht. *Rickettsia* spp. infizieren die Speicheldrüsen von Zecken während ihrer Blutmahlzeit. In der Türkei und Albanien geflaggte *I. ricinus* und andere Zeckenspezies wiesen eine Prävalenz von 50 % unter den adulten und 20 % unter den Nymphen auf (Christova et al., 2003). Zecken, die von Menschen in der Türkei abgesammelt wurden, zum großen Teil *I. ricinus*, zeigten eine Prävalenz von 3,6 % für *Rickettsia* spp. (Fernandez-Soto et al., 2004). Untersuchungen in Frankreich ergaben Prävalenzen von 16 % *Rickettsia* spp. in geflaggten *I. ricinus* (Halos et al., 2006). Speziesspezifische Untersuchungen aus den Niederlanden in geflaggten und von Haustieren abgesammelten Zecken ergaben folgende Prävalenzen: 21,5% *R. helvetica* in *I. ricinus*, 0,8 % *R. helvetica* in *I. hexagonus* und 14 % *R.*

raoulti in *D. reticulatus* (Nijhof et al., 2007). In Schweden wurde eine Prävalenz von 16-36,8 % *R. helvetica* in *I. ricinus* (Nilsson et al., 1999) ermittelt. Für *D. reticulatus*, die in der Slowakei von Wirtstieren abgesammelt wurden, konnte eine Prävalenz von 22,3-27 % für *R. raoulti* erhoben werden.

In Deutschland endemische *Rickettsia* spp. sind in erster Linie *R. helvetica* in *I. ricinus* und *R. raoulti* in *D. reticulatus*. In einer Berliner Studie wurde eine Prävalenz von 14,2 % *R. helvetica* in geflaggten *I. ricinus* Nymphen ermittelt (Pichon et al., 2006). In Süddeutschland geflaggte *I. ricinus* wiesen eine Prävalenz von 5,3 % für *Rickettsia* spp. auf, darunter 91,4 % für *R. helvetica* und 8,6 % für *R. monacensis* (Silaghi et al., 2008). Bei der Untersuchung von *D. reticulatus* in Berlin wurde eine Prävalenz von 23 % für *R. raoulti* erhoben (Dautel et al., 2006). *D. reticulatus* und *D. marginatus* aus Süddeutschland wiesen mit 30 % eine ähnliche Prävalenz auf (Pluta et al., 2010).

2.5.3 Anaplasmataceae

2.5.3.1 Systematik und Morphologie

Anaplasmataceae sind obligat intrazelluläre, gramnegative α -Proteobakterien. Diese Familie gehört mit der Familie der Rickettsiaceae zur Ordnung der Rickettsiales. Die Anaplasmataceae gliedern sich in die Gattungen *Anaplasma*, *Candidatus Neoehrlichia*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* und *Wolbachiae* (Bowman, 2011). Erst vor einigen Jahren wurde die Neuordnung der Ehrlichieae und Wolbachieae zur Familie der Anaplasmataceae vorgenommen. Außer den Symbionten der Gattung *Wolbachia* können sich alle genannten Gattungen in Wirbeltieren vermehren. Sie sind pleomorphe Kokken und parasitieren i.d.R. in Zellen, die sich aus dem Mesoderm entwickelt haben (Dumler et al., 2001). Da aus der Familie der Anaplasmataceae nur Spezies aus den Gattungen *Anaplasma*, *Ehrlichia* und *Cand. Neoehrlichia* spp. zu den zeckenübertragenen Erregern gehören, wird im Folgenden auf diese drei Genera eingegangen.

2.5.3.2 Vektoren und Übertragung

Vektoren für *Anaplasma* spp., *Cand. Neoehrlichia* spp. und *Ehrlichia* spp. sind unterschiedliche Zeckenspezies (siehe Kapitel 2.5.3.7). *Ehrlichia*, *Cand. Neoehrlichia* spp. und *Anaplasma* spp. durchlaufen einen enzootischen Kreislauf in Wildtieren und Zecken. Dabei können Menschen und verschiedene Säugetiere durch Zecken infiziert werden. *Anaplasma* und *Ehrlichia* spp. vermehren sich in parasitophoren Vakuolen (sog. Morulae) im Zytoplasma von Zellen haematopoetischen Ursprungs durch Zweiteilung (Rikihisa, 2003). *Cand. Neoehrlichia* spp. wird ein Endotheliotropismus nachgesagt (von Loewenich et al., 2010).

2.5.3.3 *Anaplasma* spp. als Krankheitserreger

Anaplasma platys ist der Erreger der caninen zyklischen Thrombozytopenie. Neben einer zyklischen Thrombozytopenie leiden erkrankte Tiere an Fieber und Lymphadenomegalie, wobei *A. platys* in Form basophiler Einschlusskörperchen in Thrombozyten in Zyklen von ca. 14 Tagen über ca. 3 Tage lang im Blut nachweisbar ist. Der Vektor dieses Erregers ist *Rhipicephalus sanguineus* (Harrus et al., 1997). Das Vorkommen der Krankheit richtet sich nach dem Vorkommen des Vektors; europäische Fallberichte stammen aus Mittelmeerländern wie Griechenland (Kontos et al., 1991), Spanien (Aguirre et al., 2006) und Italien (de la Fuente et al., 2006), aber auch in Amerika (French und Harvey, 1983), Asien (Suksawat et al., 2001) und Afrika (Sanogo et al., 2003) wird *A. platys* beobachtet. In Deutschland tritt diese Krankheit bei Hunden nur als Reise- bzw. Importkrankheit auf (Dyachenko et al., 2012).

Anaplasma ovis ist ein intraerythrozytärer Infektionserreger, der Schafe und Ziegen befällt, Vektoren sind dabei Zecken des Genus *Dermacentor* (de la Fuente et al., 2007). Obwohl eine Infektion meist unbeobachtet bleibt und leicht verläuft, sind auch schwerere Fälle verbunden mit Hämoglobinurie beobachtet worden (Hornok et al., 2007). Die geographische Verteilung in Europa beschränkt sich, ähnlich wie bei *A. platys*, auf südliche Länder wie beispielsweise Italien (de la Fuente et al., 2005) und die Türkei (Sayin et al., 1997).

Anaplasma marginale und *Anaplasma centrale* sind ätiologische Agentien der monozytotrophen Anaplasrose und gelten als Verursacher klinischer Erkrankungen bei Wiederkäuern. *Anaplasma bovis* infiziert ebenfalls Monozyten von Rindern, vorkommend in Afrika und Asien (Ooshiro et al., 2008).

Die in Deutschland für Mensch und Tier relevante Spezies ist *Anaplasma phagocytophilum*. *A. phagocytophilum* galt zunächst vor allem als tierpathogener Erreger, der zuerst durch Gordon, Brownlee, Wilson und MacLeod 1932 als Erreger des „tick-borne fever“ in kranken Schafen aus Schottland entdeckt wurde (Foggie, 1951). Dieser Erreger, verbunden mit einer fieberhaften Erkrankung, fand sich bald darauf auch in Rindern (Tuomi, 1966), Hunden (Madewell und Gribble, 1982), Pferden (Madigan und Gribble, 1987) sowie Katzen (Bjoersdorff et al., 1999). Der erste Fall eines mit *A. phagocytophilum* erkrankten Menschen wurde in den USA beschrieben (Chen et al., 1994). In Europa sind von 1997 bis 2006 22 Fälle humaner granulozytärer Anaplasrose (Abk.: HGA) beschrieben worden (Kowalski et al., 2006). Von diesen Fällen wurde keiner in Deutschland beschrieben, obwohl HGA-spezifische Antikörper in Seroprävalenzstudien nachgewiesen werden konnten (Fingerle et al., 1997). Insgesamt ist die Anzahl der Fälle der HGA in Amerika signifikant höher als in Europa, wo der Erreger in erster Linie als Pathogen bei Wiederkäuern bekannt ist (Rar und Golovljova, 2011). Dies lässt darauf schließen, dass es sich auf beiden Kontinenten um unterschiedliche Stämme von *A. phagocytophilum* handelt.

2.5.3.4 Canine granulozytäre Anaplasrose

Anaplasma phagocytophilum befällt vor allem neutrophile Granulozyten, aber auch eosinophile Granulozyten und bildet darin Zelleinschlüsse, sogenannte Morulae (Carrade et al., 2009). Betroffene Tiere leiden in absteigender Häufigkeit unter Lethargie, Anorexie, Fieber, Polyurie, Polydipsie, Durchfall, Erbrechen, Schwierigkeiten beim Aufstehen und Kollaps. Dabei fallen häufig Splenomegalie und Lahmheit auf, seltener werden weiße Schleimhäute, Epistaxis und Petechien beobachtet. Im Labor sind infizierte Tiere auffällig aufgrund einer Thrombozytopenie, Lymphopenie, Leukopenie, seltener Anämie, Neutropenie und Leukozytose (Egenvall et al., 1997; Poitout et al., 2005; Kohn et al., 2008). Die canine granulozytäre Anaplasrose ist europaweit verbreitet, unter anderem sind Fälle aus Deutschland (Kohn et al., 2008), Schweden (Egenvall et al., 1997), der Schweiz (Pusterla et al., 1997), Italien (Manna et al., 2004) und England (Bexfield et al., 2005) bekannt, aber auch in den USA wird von Hunden mit dieser Erkrankung berichtet (Poitout et al., 2005; Mazepa et al., 2010; Kane et al., 2011; Rand et al., 2011). Während die Seroprävalenz in einer Berliner Studie mit 522 gesunden und kranken Hunden bei 43,3 % lag, konnte Erreger-DNA lediglich in 5,7 % der Blutproben nachgewiesen werden (Galke, 2010; Kohn et al., 2011).

Bei Infektionen mit *A. phagocytophilum* wird mit dem Tetracyclin Doxycylin therapiert (Kohn et al., 2008). Ein Impfstoff ist nicht verfügbar.

2.5.3.5 Candidatus Neoehrlichia spp. als Krankheitserreger

Die Benennung einer neuen Bakterienspezies als *Candidatus* (Abk.: *Cand.*) wird immer dann vorgenommen, wenn eine Spezies nicht kultiviert werden konnte, obgleich eine Verwandtschaft nachgewiesen wurde und phänotypische Eigenschaften wie die Ultrastruktur bekannt sind. Die Bezeichnung findet immer dann Verwendung, wenn die Bedingungen des

„International Code of Nomenclature of Bacteria“ nicht erfüllt werden (Murray und Stackebrandt, 1995).

Zum Genus *Cand. Neoehrlichia* gehören *Cand. Neoehrlichia lotoris* und *Cand. Neoehrlichia mikurensis*. *Cand. Neoehrlichia lotoris* ist ein bislang lediglich in US-amerikanischen Waschbären detektierter zeckenübertragener Erreger aus der Familie der Anaplasmataceae und hat für andere Tiere sowie den Menschen bislang noch keine medizinische Bedeutung (Yabsley et al., 2008).

Cand. Neoehrlichia mikurensis dagegen hat in den letzten Jahren sowohl tier- als auch humanmedizinisch an Bedeutung gewonnen. Erstmals wurde dieser Erreger 1999 in niederländischen *I. ricinus* als *Ehrlichia*-ähnlicher Organismus identifiziert (Schouls et al., 1999). Auch in Russland fand sich der gleiche noch unbenannte Organismus in *Ixodes*-Zecken (Alekseev et al., 2001). Die provisorische Namensgebung als *Cand. Neoehrlichia mikurensis* fand im Jahre 2004 statt, nachdem der Erreger in wildlebenden Ratten und in *Ixodes ovatus* Zecken in Japan nachgewiesen wurde (Kawahara et al., 2004). Nachdem der Erreger zuvor nur in asymptomatischen Patienten aus Norditalien nachgewiesen wurde (Brouqui et al., 2003), konnte das Bakterium erstmals 2010 in febrilen Menschen aus Deutschland (von Loewenich et al., 2010), Schweden (Welinder-Olsson et al., 2010) und der Schweiz (Fehr et al., 2010) detektiert werden. Auch in China sind mehrere Fälle von Infektionen des Menschen bekannt geworden (Li et al., 2012). Allen Fällen gemeinsam ist der überdurchschnittlich hohe Anteil an immunsupprimierten Erkrankten. Krankheiten wurden so vor allem bei alten oder splenektomierten Menschen sowie Personen, die mit Immunsuppressiva behandelt wurden, festgestellt. Die Symptome waren unspezifisch und überwiegend gekennzeichnet durch Fieber und Kopfschmerzen. Labordiagnostisch fielen eine Leukozytose und die Erhöhung des C-reaktiven Proteins auf. Die Erkrankung konnte bis zum septischen Multiorganversagen führen, das den Tod des Erkrankten zur Folge hatte (von Loewenich et al., 2010). Es wird vermutet, dass *Cand. Neoehrlichia mikurensis* Koagulopathien auslöst, die sich durch den Endotheltropismus des Erregers erklären lassen (von Loewenich et al., 2010). Diese These wird durch die Tatsache gestützt, dass der Erreger in infizierten Ratten im Zytoplasma endothelialer Zellen der venösen Sinus identifiziert wurde (Kawahara et al., 2004). In lediglich zwei Patienten konnten intrazytoplasmatische membrangebundene Inklusionen von Bakterien ausgemacht werden (Pekova et al., 2011).

Cand. Neoehrlichia mikurensis ist auch für Hunde pathogen. So wurde eine Infektion bei einem Hund aus Deutschland festgestellt. Gekennzeichnet war der Fall durch profuse postoperative Blutungen, eine milde Anämie und Thrombozytopenie. Neben diesen Veränderungen wies das Tier jedoch keine der beim Menschen bemerkten Symptome auf. Die Therapie des Hundes war wie bei allen Mitgliedern der Anaplasmataceae mit Doxycyclin erfolgreich (Diniz et al., 2011). Aufgrund der sehr geringen Anzahl an dokumentierten Fällen ist es zu früh um die Relevanz für Hunde beurteilen zu können.

2.5.3.6 *Ehrlichia* spp. als Krankheitserreger

Das Genus *Ehrlichia* teilt sich in die *Ehrlichia canis* Gruppe sowie unklassifizierte *Ehrlichia* spp. auf. Zur *Ehrlichia canis* Gruppe gehören die Spezies *Cand. Ehrlichia shimanensis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ruminantium* und *Ehrlichia muris* (Rar und Golovljova, 2011).

Cand. Ehrlichia shimanensis stammt aus Japan und wurde erstmals in Rehwild und *Haemaphysalis longicornis* identifiziert, konnte bislang jedoch nicht als Krankheitserreger identifiziert werden (Kawahara et al., 2006). *E. muris* ruft in Mäusen in Eurasien eine Splenomegalie hervor und wird durch *Haemaphysalis* spp. und *Ixodes* spp. übertragen (Rar und Golovljova, 2011).

Für den Menschen gefährliche *Ehrlichia* spp. sind in erster Linie *E. chaffeensis* als Erreger der humanen monozytären Ehrlichiose und *E. ewingii* als Erreger der humanen granulozytären Ehrlichiose. Beide Spezies sind auch für den Hund pathogen (Thomas et al., 2009; Rar und Golovljova, 2011). Doch auch *E. ruminantium* als Erreger der „Heartwater Disease“ in Wiederkäuern ruft Ehrlichiose bei Mensch und Hund hervor (Allsopp et al., 2005; Rar und Golovljova, 2011). *E. chaffeensis* und *E. ewingii* treten in Amerika, Afrika und Asien auf und werden übertragen durch *Amblyomma americanum*. *E. ruminantium* dagegen findet sich in Afrika und der Karibik, dieser Erreger wird ebenfalls durch *Amblyomma* spp. übertragen (Rar und Golovljova, 2011).

Einzig *E. canis* als Erreger der caninen monozytotrophen Ehrlichiose mit humanpathogenem Potential tritt weltweit und somit auch in Europa auf (Perez et al., 2006). Das Vorkommen von *E. canis* beschränkt sich in Europa auf das Verbreitungsgebiet seines Vektors *R. sanguineus*; mediterrane Länder wie Portugal, Griechenland und Spanien gehören zu endemischen Gebieten (Cardoso et al., 2010; Mylonakis et al., 2010; Villaescusa et al., 2012). In Deutschland ist *E. canis* bei Hunden lediglich als Reisekrankheit bekannt (Hamel et al., 2011), die Behandlung kann wie bei *A. phagocytophilum* mit Doxycylin durchgeführt werden (Löscher et al., 2006).

2.5.3.7 Prävalenzen in Zecken

Für *Anaplasma phagocytophilum* stellen in Europa *I. ricinus* sowie *I. hexagonus*, in Asien *I. persulcatus* und in den USA *I. pacificus* und *I. scapularis* die Hauptvektoren dar (Richter et al., 1996; Bakken und Dumler, 2000; Cao et al., 2000; Hildebrandt et al., 2002). Bei Untersuchungen in den Niederlanden waren 1,6 % der untersuchten *I. ricinus* sowie 5,9 % der auf *A. phagocytophilum* untersuchten *I. hexagonus* infiziert (Nijhof et al., 2007). *A. phagocytophilum* fand sich in Thüringen in 6,5 % der adulten *I. ricinus* und in 1,2 % der untersuchten Nymphen (Hildebrandt et al., 2002). Dieser Unterschied lässt sich dadurch erklären, dass die Wahrscheinlichkeit den Erreger aufzunehmen mit jedem Saugakt steigt. Bei 3,9 % untersuchter *I. ricinus* Nymphen in einem Berliner Waldgebiet fand sich ebenfalls der Erreger (Pichon et al., 2006). Eine neuere Untersuchung wies eine ähnlich hohe Prävalenz von 4,1 % in Berliner *I. ricinus* nach, die Prävalenzen in Frankreich und Tschechien beliefen sich in dieser Studie auf 0 %, die aus Polen stammenden Zecken waren zu 2,5 % und die aus Portugal dagegen waren zu 6,9 % mit *A. phagocytophilum* infiziert (Richter und Matuschka, 2012). Weiterhin wurde das Vorkommen von *A. phagocytophilum* in 5 von 35 untersuchten *D. reticulatus* aus Belgien belegt. *D. reticulatus* galt bis dahin nicht als Vektor für den Erreger und muss nun als potentieller Vektor betrachtet werden (Wirtgen et al., 2011). Dagegen spricht eine deutsche Studie, die unter 283 *D. reticulatus* keine mit *A. phagocytophilum* infizierte Zecke identifizieren konnte (Richter et al., 2012).

Es sind bisher nur wenige Untersuchungen zu Prävalenzen von *Cand. Neoehrlichia mikurensis* in Zecken veröffentlicht. In Europa stellt *I. ricinus* den Hauptvektor dar. In Dänemark wurden an drei geographisch voneinander abweichenden Orten mit *Cand. Neoehrlichia mikurensis* infizierte *I. ricinus* geflaggt (Fertner et al., 2012). Eine Studie wies eine Prävalenz von 8,1 % in aus Deutschland stammenden wirtssuchenden *I. ricinus* nach, tschechische und französische *I. ricinus* dagegen wiesen eine Prävalenz von 10 % respektive 1,7 % auf (Richter und Matuschka, 2012). Der Nachweis des Erregers konnte außerdem in Nymphen und adulten *I. ricinus* aus Belgien und den Niederlanden erbracht werden, Larven dagegen wiesen keine Infektion auf. Weiterhin fand sich der Erreger in *I. ricinus*, die von Rotwild, dem europäischen Mufflon, Schafen und Wildschweinen abgesammelt wurden (Jahfari et al., 2012). Die Vermutung, dass *D. reticulatus* in Deutschland bislang kein Vektor ist, konnte gestützt werden (Richter et al., 2012).

2.5.4 *Borrelia* spp.

2.5.4.1 Systematik und Morphologie

Borrelia spp. sind schraubenförmige, gramnegative Bakterien von $0,2-0,5 \times 3-20 \mu\text{m}$ (Barbour und Hayes, 1986). Alle *Borrelia* spp. gehören zur Familie der *Spirochaetaceae*. Phylogenetisch lassen sie sich in Rückfallfieber-Erreger, Reptilien-assoziierte *Borrelia* Spezies und die *Borrelia burgdorferi* Gruppe als Erreger der Lyme-Borreliose einteilen (Takano et al., 2011).

Zu den Rückfallfieber-Erregern gehören unter anderem *Borrelia turicatae* und *Borrelia recurrentis*. In Europa endemische Vertreter sind *Borrelia miyamotoi*, *Borrelia hispanica* und *Borrelia persica* (Rebaudet und Parola, 2006).

Zu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*Borrelia burgdorferi* s.l.) zählen ca. 16 verschiedene Genospezies, darunter *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (*Borrelia burgdorferi* s.s.), *Borrelia spielmanii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia californiensis*, *Borrelia turdi*, *Borrelia tanuki*, *Borrelia japonica*, *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia bissettii*, *Borrelia andersonii* und *Borrelia bavariensis* (Brisson et al., 2012; Stanek et al., 2012).

2.5.4.2 Vektoren und Übertragung

B. recurrentis wird durch die Kopflaus *Pediculus humanus humanus* übertragen, jedoch sind für einen Großteil der Rückfallfieber-Borrelien Zecken aus der Familie der Lederzecken und des Genus *Ornithodoros* Vektor (Cutler, 2010). Europäische Fallbeschreibungen in Verbindung mit Lederzecken beschränken sich auf südliche Teile des Kontinents wie Spanien (Anda et al., 1996). *I. ricinus* stellt in Europa den Vektor für *B. miyamotoi* und mit diesem Erreger eng verwandte *Borrelia* spp. dar (Fraenkel et al., 2002; Richter et al., 2012).

Hauptvektoren für Erreger der Lyme-Borreliose in den USA sind *I. scapularis* und *I. pacificus*. In Europa wird dieser durch *I. ricinus* gestellt, *I. hexagonus* besitzt ebenfalls Vektorkompetenz (Gern et al., 1991). Für *D. reticulatus* konnte dies nicht bestätigt werden (Richter et al., 2012).

Die transstadiale Übertragung für *Borrelia* spp. gilt als gesichert, transovarielle Übertragung ist je nach Genospezies möglich. Bei *Borrelia burgdorferi* s.l. ist eine transovarielle Übertragung nicht möglich. Frühere Berichte hierzu lassen sich vermutlich durch die Verwechslung mit *B. miyamotoi* erklären (Stanek et al., 2012). Denn für diese *Borrelia* Spezies ist die transovarielle Übertragung bewiesen worden (Scoles et al., 2001).

2.5.4.3 Borrelien als Krankheitserreger

Durch *Borrelia* spp. verursachte Erkrankungen sind die besonders in Europa und Amerika wichtige Lyme Borreliose sowie das Rückfallfieber, welches eine größere Bedeutung in tropischen Ländern hat.

In Europa sind mindestens acht Erreger der Lyme-Borreliose bekannt, sie gehören alle zur *B. burgdorferi* s. l. Gruppe. *Borrelia burgdorferi* s. s., *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis* und *B. spielmanii* treten dabei am häufigsten in Erscheinung. *B. bissettii*, *B. valaisiana* und *B. lusitaniae* werden selten als Pathogene identifiziert (Stanek et al., 2012). Die Lyme Borreliose ist die in Europa und Nordamerika am häufigsten diagnostizierte zeckenübertragene Krankheit (Wormser et al., 2006). Symptome sind abhängig von der Genospezies, sie manifestieren sich in der Haut, in Gelenken und im Nervensystem. Verursacher der Hautform der Borreliose ist in Europa *B. afzelii* (Strle et al., 1999). Diese äußert sich durch ein Erythema migrans, welches sich einige Tage bis Wochen nach dem Zeckenstich entwickelt und mit Fieber, Kopfschmerzen, Athralgie und Myalgie einhergehen kann. Ohne Behandlung kann das Erythem mehrere Monate anhalten, ist dann jedoch

selbstlimitierend. Eine weitere Erscheinungsart der Hautform der Borreliose, Acrodermatitis chronica atrophicans, ist charakterisiert durch rot-bläuliche Erhabenheiten der Haut der Extremitäten, die Erkrankung ist chronisch progressiv, im Krankheitsverlauf kann es zur Ausbildung fibroider Nodula und einer Hautatrophie kommen (Stanek et al., 1996). Bei Kindern tritt häufiger das Borrelien-Lymphozytom in Erscheinung, ein schmerzloser blauer Knoten am Ohrtrand oder Skrotum. Die Neuroborreliose äußert sich durch akutes Auftreten zentralnervöser Symptome nur wenige Wochen nach der Infektion. Eine schmerzhafte Meningoradiculoneuritis sowie uni- oder bilaterale Fazialisparesen sind typische Symptome. Ein Neurotropismus wird insbesondere *B. garinii* zugesprochen (Lebech et al., 1994). Die Lyme-Arthritis äußert sich in rekurrenten oder persistierenden Gelenkschwellungen eines oder mehrerer großer Gelenke, häufig des Knies, die mehrere Jahre andauern können. Dabei gilt insbesondere *B. burgdorferi* s. s. als Verursacher (Stanek et al., 2012). Die Lyme-Borreliose kann sich selten auch okulär oder myokardial manifestieren (Stanek, 2005).

Endemische Fälle des Rückfallfiebers sind auf Südeuropa beschränkt, was mit der erwähnten Verbreitung der Vektoren zusammenhängt, es ist jedoch eine ernstzunehmende Reisekrankheit. Insbesondere Menschen, die mit rekurrenten Fieberschüben aus den Tropen zurückkehren, sollten auf Erreger des Rückfallfiebers untersucht werden (Rebaudet und Parola, 2006). Symptome sind hohes Fieber, Kopfschmerzen, Myalgie, Athralgie und Husten (Sonenshine, 1993). Bedingt durch den Neurotropismus der Erreger treten auch lymphozytäre Meningitiden sowie Fazialisparesen in Verbindung mit Rückfallfieberinfektionen auf (Cadavid und Barbour, 1998). In der Regel dauert die erste Krankheitsperiode ca. drei Tage an, gefolgt von einer zweiten mildereren Episode ca. sieben Tage später. Daraufhin können in ca. siebentägigem Abstand weitere jeweils ein bis zwei Tage andauernde Episoden folgen. Eine Besserung tritt durch Produktion von Antikörpern gegen die antigenetisch verschiedenen Typen, die in den jeweiligen Episoden durch die *Borrelia* spp. präsentiert werden, ein (Parola und Raoult, 2001). Berichte von Krankheitsausbrüchen sind bislang aus den USA, Südamerika, Afrika, Asien und Südeuropa bekannt (Cadavid und Barbour, 1998). Im Zusammenhang mit *B. miyamotoi* wurde nur in wenigen Fällen rekurrentes Fieber beobachtet. Teilweise kam es bei betroffenen Patienten, ähnlich der Lyme-Borreliose zur Ausbildung eines Erythema migrans (Platonov et al., 2011).

2.5.4.4 Borreliose des Hundes

Auch wenn die Kochschen Postulate für Hunde nur für *Borrelia burgdorferi* s.s. belegt werden konnten (Wasmoen et al., 1992), so wurde auch *B. garinii* in natürlich infizierten klinisch symptomatischen Hunden nachgewiesen (Baranton et al., 1992; Hovius et al., 1999; Inokuma et al., 2013). Die Pathogenität von *B. afzelii* für den Hund ist fraglich (Inokuma et al., 2013). Klinische Syndrome, die mit der caninen Borreliose in Verbindung gebracht werden, sind Polyarthritiden und Glomerulopathie (Littman et al., 2006). Die Symptomatik beinhaltet Lethargie, Lahmheit, Pyrexie und Anorexie und Lymphadenopathie im Bereich des Zeckenstichs (Straubinger et al., 1998; Goossens et al., 2001; Summers et al., 2005). Bei Infektionen älterer Hunde wird gelegentlich von neurologischen Dysfunktionen berichtet (Chang et al., 2001; Goossens et al., 2001). Die Seroprävalenz liegt in Deutschland bei ca. 10 % (Magnarelli et al., 1985; Krupka et al., 2007). Natürliche Infektionen klinisch asymptomatischer Hunde wurden unter anderem in den USA und den Niederlanden nachgewiesen (Magnarelli et al., 1985; Hovius et al., 1999). Bei einem Vergleich klinisch asymptomatischer und symptomatischer Hunde mit Antikörpertitern gegen *Borrelia* spp. fiel jedoch auf, dass klinisch auffällige Tiere ein größeres Spektrum an Antikörpern produzieren (Hovius et al., 2000).

Borrelia spp. sind empfindlich gegenüber Tetracyklinen, den meisten Penicillinen, Cephalosporinen und Makroliden (Stanek et al., 2012). Mehrere Impfstoffe für Hunde sind in Deutschland verfügbar. Ein Präparat (Eurican Merilym) enthält einen in Europa isolierten Stamm von *B. burgdorferi* s. s.. Zwei weitere Präparate (RIVAC[®] Borrelia und Virbagen canis B[®]) enthalten inaktivierte Formen von *B. afzelii* und *B. garinii*. Eine geringe Kreuzreaktivität

durch die speziesspezifische Wirkung verursacht das Fehlen des Schutzes vor heterologen *Borrelia* Spezies (Töpfer und Straubinger, 2007).

2.5.4.5 Prävalenzen in Zecken

In Europa gibt es nur wenige Untersuchungen von Zecken auf Rückfallfiebererreger. Für *B. miyamotoi* wurde in *I. ricinus* aus Deutschland und Frankreich eine Prävalenz von 3,5 % nachgewiesen. Da in dieser Studie keine Koinfektionen auszumachen waren, wird vermutet, dass sich Rückfallfieber-Borrelien und Lyme-Borrelien gegenseitig ausschließen (Richter et al., 2003).

Erreger der Lyme-Borreliose sind in Zentraleuropa in den meisten Ländern in einer Größenordnung von 7,6-40 % im Vektor *I. ricinus* vorhanden. Niederländische *I. ricinus* waren in einer Höhe von 7,6 % (Wielinga et al., 2006) und 13,2 % (Schouls et al., 1999) mit *Borrelia* spp. infiziert. In Frankreich wurde eine Prävalenz von *B. burgdorferi* s. l. von 18 % festgestellt (Halos et al., 2006). In einer weiteren Studie aus Zentraleuropa lag die Prävalenz in *I. ricinus* bei 22,3 % (Richter und Matuschka, 2012). Bei einer Untersuchung in Bulgarien dagegen lag die Prävalenz von *B. burgdorferi* s. l. in *I. ricinus* bei 40 %, dabei machte über die Hälfte der Erreger *B. afzelii* aus (Christova et al., 2003).

Borrelia burgdorferi s. l. waren in Bayern mit einer Prävalenz von 15,8% in untersuchten *I. ricinus* vorhanden. Darunter machte ebenfalls den größte Anteil *B. afzelii* aus, gefolgt von *B. valaisiana*, *B. burgdorferi* s. s. und *B. spielmanii* (Vogel et al., 2012).

2.6 Weitere wichtige zeckenübertragene Erkrankungen in Mitteleuropa

2.6.1 Frühsommermeningoenzephalitis

Die Frühsommermeningoenzephalitis (FSME) wird durch das FSME-Virus hervorgerufen, dieses gehört der Familie der Flaviviridae an, Überträger sind ixodide Zecken (Labuda et al., 1997). Die FSME äußert sich beim Menschen in unspezifischen Influenza-ähnlichen Symptomen gefolgt von einem asymptomatischen Intervall und einer zweiten Krankheitsphase mit Meningitis, Meningoencephalitis, Meningoencephalomyelitis oder Meningoradiculoneuritis (Haglund und Gunther, 2003). Bei Hunden wird von einer ähnlichen Symptomatik berichtet. Die Krankheit kann bei ihnen perakut und letal sowie subakut und chronisch verlaufen (Leschnik et al., 2002). Durch den Anstieg der humanen Krankheitsfälle in den letzten Jahren muss auch in der Tiermedizin mit einem vermehrten Vorkommen dieses Virus gerechnet werden (Beugnet und Marie, 2009). Die FSME gehört in Deutschland zu den meldepflichtigen Krankheiten. Die Ständige Impfkommission des Robert-Koch-Institut empfiehlt in Risikogebieten exponierten Personen sowie beruflich durch FSME gefährdeten Personen (Forstarbeiter, exponiertes Laborpersonal) eine aktive Immunisierung (Kiehl und Fehrmann, 2001).

2.6.2 Bartonellose

Erreger der Bartonellose sind gramnegative Bazillen, die der Gattung *Bartonella* angehören. Sie gelten als sich ausbreitende und verstärkt auftretende Infektionserreger. Überträger sind neben der Sandmücke, der Laus, dem Katzenfloh und Milben auch Zecken (Breitschwerdt und Kordick, 2000). Innerhalb der letzten 20 Jahre ist die Anzahl bekannter humanpathogener Spezies von zwei auf mindestens 14 gestiegen (Buss et al., 2012). Die damit verbundene Symptomatik umfasst beim Menschen Fieber, Kopfschmerzen, Hautausschlag, Lymphadenopathie, Gelenkschmerzen, Anämie und psychische Symptome (Regnery und Tappero, 1995). An Bartonellose erkrankte Hunde können Lahmheit,

Endokarditis sowie granulomatöse Lymphadenitis und Hepatitis entwickeln (Breitschwerdt und Kordick, 2000; Breitschwerdt et al., 2004; Chomel et al., 2006).

2.6.3 Tularämie

Erreger der Tularämie ist *Franciscella tularensis*, ein aerobes, pleomorphes gramnegatives intra- und extrazellulär lebendes Stäbchenbakterium (Parola und Raoult, 2001). Es existieren zwei wichtige Subspezies, *Franciscella tularensis tularensis* und *Franciscella tularensis holarctica*. Während *F. tularensis tularensis* in Nordamerika vorkommt und die virulenteste Subspezies darstellt, ist *F. tularensis holarctica* in Eurasien und Nordamerika endemisch (Christova et al., 2004). *F. tularensis holarctica* bewirkt leichter verlaufende Krankheiten bei Menschen und Tieren (Hollis et al., 1989). Die Erreger können über Aerosole, kontaminiertes Wasser, Bisse infizierter Tiere und Arthropoden wie Fliegen, Moskitos und Zecken übertragen werden. Ein weiterer Übertragungsweg verläuft über den unmittelbaren Kontakt mit dem Blut infizierter Tiere, wie er beispielsweise bei der Hasenschlachtung gegeben ist. Erkrankte Menschen leiden an Fieber, Kopfschmerzen, Erbrechen, Anorexie und Lethargie. Häufig wird von regionaler Lymphadenopathie im Bereich der Eintrittsstelle des Erregers berichtet. Die Krankheit kann sich glandulär, okuloglandulär, pharyngeal, typhoidal, pleuritisch und pneumonisch auswirken. Ohne adäquate antibiotische Behandlung kann die Krankheit tödlich verlaufen (Parola und Raoult, 2001). Selten können auch Hunde erkranken, infizierte Tiere zeigen Symptome wie Anorexie, Apathie und geringgradiges Fieber. Die Tularämie gehört in Deutschland zu den meldepflichtigen Krankheiten (Christoph, 1997).

2.6.4 Q-Fieber

Q-Fieber ist eine ubiquitäre Erkrankung, hervorgerufen durch *Coxiella burnetii*, einem obligat intrazellulären gramnegativen Bakterium. Die primären Übertragungswege laufen über die Ingestion oder Inhalation des Erregers. Der Infektionsweg beim Hund kann über Zeckenstiche, Verzehr von Plazenten oder Milch infizierter Wiederkäuer sowie über Inhalation infektiöser Aerosole verlaufen (Maurin und Raoult, 1999). *C. burnetii* findet sich in infizierten Säugetieren und aus ihnen gewonnenen Produkten, meistens denen von Schafen und Ziegen. Der Kot infizierter Zecken weist eine besonders hohe Konzentration des Erregers auf und dieser kann über lange Zeit in der Umwelt persistieren (Parola und Raoult, 2001). Das Krankheitsbild des Menschen kann von asymptomatischen Verläufen über milde Erkrankungen mit spontaner Ausheilung bis hin zu schwerwiegenden Komplikationen und sogar zum Tod führen. Es wird von Meningoenzephalitis, Myokarditis und Endokarditis berichtet. Q-Fieber während der Schwangerschaft kann Auslöser von Aborten, Frühgeburten und untergewichtigen Nachkommen sein. Berichte über erkrankte Hunde sind selten, es wird von Bronchopneumonie, Fieber und Milzvergrößerung im Zusammenhang mit dem Erreger berichtet (Werth, 1989). Symptome erkrankter tragender Hündinnen können Aborte, Frühgeburten oder erhöhtes Welpensterben sein (Maurin und Raoult, 1999). Für Q-Fieber besteht in Deutschland Meldepflicht.

2.7 Abschätzung des Infektionsrisikos

2.7.1 Übertragungszeiten verschiedener Erreger

Die Zeitspanne vom Anheften einer infizierten Zecke bis zur Inokulation von genügend vielen Erregern, die zur Etablierung einer Infektion benötigt wird, ist wichtig zur Abschätzung des Infektionsrisikos, das von einer angesogenen Zecke ausgeht. Daher wurden in einigen Studien Übertragungszeiten der verschiedenen zeckenübertragenen Erreger untersucht.

Die längste Übertragungszeit für die hier untersuchten Erreger ist für *B. canis canis* ermittelt worden. *D. reticulatus* benötigt eine 48-72 Stunden andauernde Blutmahlzeit, bis sich infektiöse Sporozoiten von *Babesia canis canis* gebildet haben, die in die Stichwunde abgegeben werden können. Eine Ausnahme sind infizierte männliche *D. reticulatus*, die bei einer zweiten Blutmahlzeit die infektiösen Stadien sofort übertragen können (Heile et al., 2007).

Die Übertragungszeit von *A. phagocytophilum* wurde durch das Ansetzen infizierter Zecken an Mäuse bestimmt. Dabei fand in zwei von drei Fällen eine Übertragung des Erregers in weniger als 24 Stunden statt (des Vignes et al., 2001). Zu *Rickettsia* spp. gibt es bislang keine Untersuchungen zur Übertragungszeit. Da diese aber mit *A. phagocytophilum* gemeinsam der Ordnung *Rickettsiales* angehören, kann von einer ähnlich kurzen Übertragungszeit ausgegangen werden (Heile et al., 2007).

Borrelia burgdorferi s.l. konnten im Infektionsversuch mit infizierten *Ixodes* Nymphen in weniger als 16 Stunden Blutmahlzeit einer Zecke übertragen werden (Kahl et al., 1998).

2.7.2 Abschätzung der Saugdauer aus dem Scutal Index

Über die Ermittlung der Dauer der Blutmahlzeit einer Zecke lässt sich eine Aussage zum Infektionsrisiko der Wirte machen (Meiners et al., 2006). Daher gibt es mehrere Studien, die sich mit verschiedenen Indizes, die anhand von Körpermaßen der Zecke berechnet werden, auseinandersetzen. Eine davon liefert Daten zum Scutal Index (SI) in Verbindung mit der Dauer der Blutmahlzeit weiblicher Zecken und nymphaler Stadien der Spezies *Ixodes scapularis* (Falco et al., 1996). Dazu wurden als Zeitpunkte der Messungen jeweils 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Beginn der Blutmahlzeit gewählt. Der SI berechnet sich dabei durch einen Quotienten aus der Länge des Zeckenkörpers beginnend an der Basis Capituli und der Breite des Scutum der Zecke an seiner breitesten Stelle (siehe 3.2.1). Es konnten keine signifikanten Unterschiede des SI von Zecken, die nach 0 oder 24 Stunden entfernt wurden, gemessen werden. Alle zu späteren Zeitpunkten gemessenen SIs wiesen dagegen signifikante Unterschiede auf. Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine weitere Studie, in der ebenfalls *I. scapularis* vermessen wurden, um den SI nach 0, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden zu bestimmen (Yeh et al., 1995). Die Berechnungsergebnisse unterschieden sich auch hier erst nach über 24 Stunden in einem signifikanten Maß.

Auf die Studien nach Falco et al. (1996) und Yeh et al. (1995) bezieht sich eine deutsche Studie, in deren Verlauf weibliche *I. ricinus* und *D. reticulatus* untersucht wurden. Dabei wurden die Messzeitpunkte bei 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7 Tagen nach Beginn der Blutmahlzeit gesetzt und der SI nach oben beschriebener Methode bestimmt (Dautel et al., 2006). Die darin berechneten SIs, der jeweiligen Dauer der Blutmahlzeit zugeordnet, sind in Tab. 5 dargestellt und wurden als Richtwerte für eigene Messungen verwendet.

Tab. 5: Vermutliche Dauer der Blutmahlzeit von gesogenen weiblichen *I. ricinus* und *D. reticulatus* auf Basis von SI-Messungen (Dautel et al., 2006).

Dauer der Blutmahlzeit in Tagen	Scutal Index
1	1,7-2,3
2	2,31-2,75
3	2,76-3,50
4	3,51-4,50
5	4,51-6,00
6	6,01-8,00
>6	>8,00

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Reaktionskits, Mikroorganismen und Medien

Reaktionskit	Bezugsquelle
Zero Blunt [®] TOPO [®] PCR Cloning Kit mit One Shot [®] TOP10 chemisch kompetenten <i>E. coli</i>	INVITROGEN, Karlsruhe, Deutschland
NucleoSpin [®] Blood	MACHEREY&NAGEL, Düren, Deutschland
NucleoSpin [®] 8 Blood	MACHEREY&NAGEL, Düren, Deutschland
NucleoSpin [®] 96 Blood	MACHEREY&NAGEL, Düren, Deutschland
NucleoSpin [®] Plasmid	MACHEREY&NAGEL, Düren, Deutschland
Maxwell [®] 16 LEV Blood DNA Kit	PROMEGA, Madison, Wisconsin, USA
High Pure PCR Product Purification Kit	ROCHE APPLIED SCIENCE, Mannheim, Deutschland
Luria Bertani (LB)-Agar	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Luria Bertani (LB-Medium)	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
DNA Clean & Concentrator [™] - 5	ZYMO RESEARCH CORPORATION, Irvine, Kalifornien

3.1.2 Enzyme, Puffer, Lösungen und Reagenzien

Enzym	Bezugsquelle
EvaGreen [®]	BIOSCIENCE, Jena, Deutschland
BacilloI [®] plus	BODE CHEMIE, Hamburg, Deutschland
dNTP Mix (10 mM each)	FERMENTAS, St.Leon-Rot, Deutschland
Gene Ruler [™] 1kb DNA Ladder, Gene Ruler [™] 100bp DNA Ladder, Gene Ruler [™] 50bp DNA Ladder, Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker	FERMENTAS, St.Leon-Rot, Deutschland
Glycogen RNA Grade,	FERMENTAS, St.Leon-Rot, Deutschland

Maxima [®] Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase, 10× Hot Start PCR Buffer 25 mM MgCl ₂	FERMENTAS, St.Leon-Rot, Deutschland
Phusion Hot Start II High-Fidelity Polymerase, 5× Phusion HF Buffer	FINNZYME, Vantaa, Finnland
Essigsäure, 100 %	HONEYWELL SPECIALITY CHEMICALS, Seelze, Deutschland
Oligonukleotide	INVITROGEN, Karlsruhe, Deutschland
GRGreen (GRSafe) Nucleic Acid Gel Stain	LABGENE SCIENTIFIC SA, Chatel-St- Denis, Schweiz
Händedesinfektionsmittel AHD 2000 [®]	LYSOFORM, Berlin, Deutschland
Agarose NEEO Ultra Qualität Roti [®] garose,	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Carbenicillin Dinatriumsalz >90 % für die Biochemie	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat,	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 99,8 % DAB reinst	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin, 2-Propanol (reinst)	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat ≥98,5%,reinst, wasserfrei	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat ≥99 %	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid Plätzchen	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Roti [®] -Nukleinsäurefrei	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-acetat PUFFERAN [®] , ≥99 %	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Wasser (nukleasefrei)	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol ROTISOLV [®] , ≥99,95 %	ROTH, Karlsruhe, Deutschland

3.1.3 Herstellung von Medien und Puffern

Name	Reagenzien
Bromphenolblaulösung (0,5 %)	1 g Bromphenolblau in 200 ml Aqua bidest lösen.
EDTA (pH 8,0)	18,61 g Dinatrium-EDTA (Titriplex) ad 100 ml Aqua bidest, pH mit HCl und NaOH-Plätzchen einstellen.
Loading Dye 6×	1 mM TrisHCl (pH 7,6), 6 ml Bromphenolblaulösung (0,5 %), 60 ml Glycerol (100 %) und 12 ml EDTA (500 mM) ad 100 ml Aqua bidest. Vor Benutzung 1:6 verdünnen.
Luria Bertani (LB)-Agar	15 g LB-Agar pro 1 l LB-Medium autoklavieren und vor Gebrauch mit Antibiotika (Kanamycin oder Carbenicillin 50 µl/ml) versetzen
Luria Bertani (LB-Medium)	25 g/l, autoklavieren und vor Gebrauch mit Antibiotika (Kanamycin oder Carbenicillin 50µl/ml) versetzen
Natriumacetat-Lösung (3M, 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.
TAE-Puffer 50×	242 g Tris-aminomethan-acetat mit 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) und 57 ml Essigsäure versetzen, ad 1000 ml Aqua bidest. Vor Benutzung 1:50 mit Aqua bidest verdünnen.

Verwendete Primer und Sonden

Sequenz	Name	Quelle
5' CTAAGAATTTACCTCTGACAGT 3' 5' GACACAGGGAGGTAGTGACAAG 3'	RLB-R2 RLB-F2	Matjila et al., 2004
5' AACCCAAAGACTTTGATTTCTCTC 3'	B.mic1075lo	Unveröffentlicht, Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, Freie Universität Berlin
5' GCTAAAGCTAAGGATAAAAATGAT 3' 5' TCAATAAAATATTCATCTTTAAGAGC 3'	RmasgltA863up RmasgltA1065lo	Unveröffentlicht, Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, Freie Universität Berlin
5' CCATTTAGGTTAATGGGTTTTGGTCATCGTGT 3' 5' ACTCGGGCAGCTAGACAACAATCCGCTCT 3'	Sonde 887-918 Sonde 982-1010	Unveröffentlicht, Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, Freie Universität Berlin
5' CCTATGGCTATTATGCTTGC 3'	CS409d	Roux et al., 2000
5' GGGGATGATGTCAARTCAGCAY 3' 5' CACCAGCTTCGAGTTAAGCCAAT 3'	A/Efor A/Erev	modifiziert nach Tabar et al., 2008
5' GTAAGGAAATTAGTTTATGTCTTT 3' 5' TAAGCTCTTCAAAAAAAGCATCTA 3'	Hbb640 HbbBw	Portnoi et al., 2006
5' CTAACGCTGGCAGTGCGTCTTAAGC 3' 5' AGCGTCAGTCTTGACCCAGAAGTTC 3' 5' AGTCAAACGGGATGTAGCAATAC 3' 5' GGTATTCTTTCTGATATCAACAG 3'	16S1A 16S1B 16S2A 16S2B	Richter et al., 2003

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
PCR-Gefäße (0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml)	BIOZYM, Hessisch-Oldendorf, Deutschland
PCR Single Cap 8er-Soft Strips 0,2 ml, PCR 96-Well TW-MT Platte (weiß)	BIOZYM, Hessisch-Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter (10 µl, 100 µl, 1000 µl, 5000 µl)	BIOZYM, Hessisch-Oldendorf, Deutschland
Homogenisationspistills	DUNN, Asbach, Deutschland

Pipettenspitzen mit Filter (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	NERBE PLUS, Winsen/Luhe, Deutschland
Handschuhe Rotiprotect-Latex, Nitrilhandschuhe	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
KIMTECH Mehrfachwischtücher, Rotizell® Tissue-Tücher, Bacillol Tissues,	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Parafilm M, Autoklavierband	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Rotibo®-Skalpelli-Klingen	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Wägeschälchen, Chemikalienlöffel	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Petrischalen	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland

3.1.5 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
TMix	ANALYTIK JENA, Jena, Deutschland
Multipipette 10-300 µl e 300	BIOHIT, Helsinki, Finnland
Netzgerät Standard Power Pack P25, Power Pack P25 T, Gelelektrophoresekammer Agagel Maxi	BIOMETRA, Göttingen, Deutschland
Gießstände	BIORAD, München, Deutschland
iCycler Thermal Cycler, C1000™ Thermal Cycler, S1000™ Thermal Cycler, CFX96™ Real-Time System	BIORAD, München, Deutschland
Netzgerät Power Pac™ Universal Supply, Gelelektrophoresekammern Sub Cell GT, Mini Sub Cell GT, Wide Mini Sub Cell GT	BIORAD, München, Deutschland
Synergy 4, Take 3 Platte	BIOTEK, Bad Friedrichshall, Deutschland
Multipipette® Xstream	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
Pipetten: 1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl, 500-5000µl	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5430 R mit Rotoren: FA-45-30-11, A-2-MTP, F-45-64-5-PCR	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
Vortexer REAX 2000	HEIDOLPH, Schwabach, Deutschland

Biofuge 13	HERAEUS, Hanau, Deutschland
Akkubetriebene Pipettierhilfe Pipetus®	HIRSCHMANN LABORGERÄTE GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Magnetrührer IKA Combimag RCT, IKA® Vortex GENIUS 3	IKA, Staufen, Deutschland
Vakuumpumpe Laboport	KNF NEUBERGER AG, Freiburg, Deutschland
DFC360FX Kamera	LEICA MICROSYSTEMS GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica MZ 16F Stereomikroskop	LEICA MICROSYSTEMS GmbH, Wetzlar, Deutschland
NucleoVac 96 Vacuum Manifold	MACHERY-NAGEL, Düren, Deutschland
Wasserbad	MEMMERT, Schwabach, Deutschland
Tischzentrifuge	NEOLAB, Heidelberg, Deutschland
MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stand	PROMEGA, Madison, Wisconsin, USA
Maxwell 16	PROMEGA, Madison, Wisconsin, USA
Pinzetten	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Waage Acculab ALC-1100.2	SARTORIUS LABORATORY, Göttingen, Deutschland
Lichtquelle KL 750	SCHOTT AG, Mainz, Deutschland
Flockeneisbereiter Scotsman® AF 100	SCOTSMAN ICE SYSTEMS, Vernon Hills, Illinois
Großraummikrowelle	SHARP, Hamburg, Deutschland
Autoklav	SHP STERILTECHNIK AG, Magdeburg, Deutschland
Digital Graphic Printer UP-D897	SONY, Berlin, Deutschland
Geldokumentation G:Box	SYNGENE, Cambridge, Großbritannien
Sicherheitswerkbank MSC-Advantage	THERMO SCIENTIFIC, Bonn, Deutschland
Wärmeschüttelschrank MAX Q 6000	THERMO SCIENTIFIC, Bonn, Deutschland
TKA-GenPure	TKA WASSERAUFBEREITUNGSSYSTEME, Niederelbert, Deutschland
pH-Meter 761 Calimatic	KNICK, Berlin, Deutschland

Gas-Sicherheitsbrenner Gasprofi 1 SCS micro	VWR, Darmstadt, Deutschland
---	-----------------------------

3.1.6 Software

Software	Bezugsquelle
R	The R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich
Biorad CFX Manager 2.0	BIORAD, München, Deutschland
Precision Melt Analysis™ Software	BIORAD, München, Deutschland
Gen5	BIOTEK INSTRUMENTS GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland
ClustalX 2	Larkin et al., 2007
jMODELTEST	Posada, 2008
GraphPad Prism 5.03	GRAPHPAD PRISM, La Jolla, USA
BioEdit	Hall, 1999
Leica LAS AF	LEICA MICROSYSTEMS GmbH, Wetzlar, Germany
Microsoft® Office for Mac 2011	MICROSOFT, Redmond, USA
BLAST®	Altschul et al., 1990
PhyML	Guindon und Gascuel, 2003
Clonemanager professional 9	SCIENTIFIC&EDUCATIONAL SOFTWARE, Cary, North Carolina
Gene Snap 7.09.06	SYNGENE, Cambridge, UK
Sigma Plot	SYSTAT SOFTWARE, Chicago, USA
End Note X5	THOMSON REUTERS, San Francisco, USA

3.1.7 Biologisches Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Zecken stammen aus einem am Berliner Fachbereich für Tiermedizin abgeschlossenen Dissertationsprojekt (Beck, 2012). Darin wurden Hundebesitzer aus Berlin und Brandenburg mit ihren insgesamt 441 Hunden akquiriert, um über den Zeitraum eines Jahres (1. März 2010 bis 31. März 2011) Zecken von ihren Hunden abzusammeln und einzureichen. Die teilnehmenden Hundebesitzer erhielten dazu bei Studienbeginn verschleißbare Röhrchen, die 80 % Ethanol enthielten. Gesammelte Zecken wurden dann durch die Hundebesitzer in Alkohol konserviert und in den teilnehmenden Tierarztpraxen und der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin abgegeben. Für jeden teilnehmenden Hund wurde ein Fragebogen ausgefüllt, der tierspezifische Informationen abfragte. Dazu zählten unter anderem die Felllänge, Geschlecht und Größe des Hundes, Häufigkeit von Parasitenbefall und die Art der Zeckenbekämpfung. Zu jeder abgegebenen Zecke wurde ein weiterer Fragebogen ausgefüllt, der unter anderem Informationen zum Funddatum, zur Art der Zeckenentfernung und zum Fundort erfassen sollte. Die in 80 % Ethanol konservierten Zecken wurden im Laufe des ersten Dissertationsprojektes nach Zeckenart und Stadium bzw. Geschlecht bestimmt (Tab. 6).

Tab. 6: Anzahl der vom 1. März 2010 – 31. März 2011 gesammelten Zecken, nach Spezies, Geschlecht/Stadium bestimmt (Beck, 2012).

Stadium/ Geschlecht	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i>	<i>Ixodes hexagonus</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Summe
weiblich	671	484	143	1	1299
männlich	119	295	8	0	422
Nymphen	5	1	1	0	7
Summe	795 (46 %)	780 (45 %)	152 (9 %)	1 (<1 %)	1727 (100 %)

Im aktuellen Dissertationsprojekt wurden die Zecken nach Spezies sortiert und durchnummeriert:

Für 780 *D. reticulatus* wurden die Bezeichnungen D001 bis D782 verwendet, wobei zwei dieser Zecken nachträglich aus der Untersuchung ausgeschlossen werden mussten, da sie nicht innerhalb des Untersuchungszeitraumes abgegeben wurden. Zecken der Art *I. hexagonus* wurden von lh001 bis lh152 benannt. Für 795 *I. ricinus* wurden die Bezeichnungen lr001 bis lr797 verwendet. Das eine Exemplar der Art *Rhipicephalus sanguineus* wurde mit der Laborbezeichnung R1 versehen, jedoch nicht weiter untersucht, da diese Zecke laut Hundebesitzerangaben vermutlich aus Südfrankreich eingeschleppt wurde. Die Laborbezeichnung stimmte mit der tatsächlich vorliegenden Anzahl der Zecken nicht überein, weil drei Zecken nach ihrer Durchnummerierung im Labor nachträglich aus der

Untersuchung ausgeschlossen werden mussten, da sie außerhalb des Studienzeitraumes eingereicht wurden.

3.2 Methoden

3.2.1 Messung des Scutal Index

Um Informationen zur Dauer des Saugaktes jeder Zecke zu bekommen, wurde der Scutal Index (SI) bestimmt. Messungen dazu wurden an 772 *I. ricinus*, 146 *I. hexagonus* sowie 776 *D. reticulatus* durchgeführt. An insgesamt 33 Zecken konnten keine Messungen durchgeführt werden, da diese in unvollständigem Zustand eingereicht wurden. Der SI jeder im Ganzen vorliegenden Zecke wurde über den Quotienten aus Körperlänge und Breite des Scutums berechnet (Falco et al., 1996). Dazu wurden Aufnahmen mittels Leica DFC360FX Kamera gemacht, die an ein Leica MZ 16F Stereomikroskop angebracht war. Über die Leica LAS AF Software wurden folgende Messungen an den Aufnahmen durchgeführt: Körperlänge beginnend an der Basis Capituli zum Ende des Abdomens sowie Breite des Scutums an der breitesten Stelle (Abb. 4). Errechnete Indizes wurden mit in der Literatur ermittelten Werten verglichen, um eine Aussage über die Dauer des Saugaktes zu erhalten (Dautel et al., 2006).

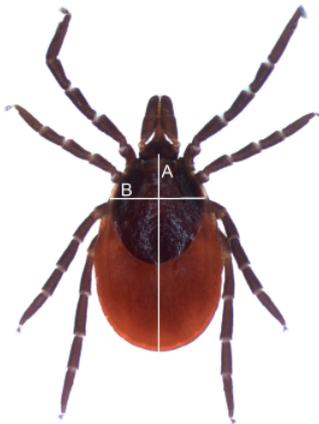


Abb. 4: *I. ricinus*, weiblich. Messungen zur Berechnung des SI als Quotient von Körperlänge ausgehend von der Basis Capituli (A) geteilt durch die Breite des Scutums an seiner breitesten Stelle (B) (Aufnahme Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin).

3.2.2 DNA-Isolation

Die Isolation von DNA wurde bei allen Zecken durchgeführt. Bei 21 Proben *I. ricinus* verlief die Isolation fehlerhaft und es konnte dabei keine DNA gewonnen werden. Diese Proben wurden im Folgenden von allen weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

3.2.2.1 DNA-Isolation mittels NucleoSpin®

Um Erreger in Zecken nachweisen zu können, musste zunächst die enthaltene DNA isoliert werden. Dadurch wurden PCR-Inhibitoren wie Blut- oder Zeckenbestandteile und Ethanol aus dem Probenmaterial entfernt, Zellen aufgeschlossen und die Bedingungen für die nachfolgende Polymerase Kettenreaktion optimiert. Dabei fand eine Lyse der Zellen statt, die mechanisch und durch die Zugabe einer Proteinase durchgeführt wurde. Die Auswahl der Zecken für die unterschiedlichen DNA-Extraktionsmethoden wurde per Zufallsprinzip

durchgeführt. Die DNA der ersten 219 *I. ricinus* wurde mittels NucleoSpin® Blood Kit, NucleoSpin® 8 Blood Kit bzw. NucleoSpin® 96 Blood Kit isoliert. Dazu wurde jede Zecke in ein beschriftetes 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt und mit 50 µl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) versetzt. Es folgte eine Quetschung der Zecke mittels Pistill. Pistills wurden vor ihrer Benutzung in Roti®-Nukleinsäurefrei eingelegt und autoklaviert. Dann wurden 180 µl B3 Puffer aus dem Kit sowie 25 µl Proteinase K hinzugegeben. Die Ansätze wurden über 15 h bei 56 °C im Thermomixer bei 4,7×g inkubiert.

Für die Isolation von DNA aus bis zu 8 Proben wurde das NucleoSpin® Blood Kit genutzt. Jede Probe wurde nach oben aufgeführter Vorbereitung bis nach Inkubation über 15 h bei 56 °C im Thermomixer behandelt, dann mit 210 µl Ethanol versetzt, mittels Vortexer gemischt und für ca. 10 s in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das gesamte Probenvolumen wurde auf die Nucleo Spin Säule pipettiert. Die DNA hat sich an die Silicamembran der Nucleo Spin Säule gebunden, dann wurde 1 min bei 28.300×g zentrifugiert. Die Auffangröhrchen wurden entleert und gewechselt, es folgte die Zugabe von 600 µl BW-Puffer auf die Nucleo Spin Säule. Dadurch wurden unerwünschte Inhaltsstoffe von der Säule gewaschen. Dieser Ansatz wurde für eine min bei 28.300×g zentrifugiert. Die Auffangröhrchen wurden entleert und es wurde für weitere 2 min bei 28.300×g zentrifugiert. Die Säulen wurden entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt. Im folgenden Schritt wurden 50 µl von auf 70 °C vorgewärmtem BE-Puffer auf die Säule pipettiert und diese 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch löst sich die DNA von der Silica-Membran. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 28.300×g für 1 min. Die Eppendorfröhrchen mit enthaltener DNA wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei - 80 °C gelagert.

Die Isolation von mehr als 8 Proben in einem Versuchsansatz wurde mit dem NucleoSpin® 8 Blood Kit oder dem NucleoSpin® 96 Blood Kit durchgeführt. Hierzu wurde nach oben beschriebener Vorbereitung und Inkubation der Proben zu jedem Ansatz 210 µl Ethanol hinzugefügt, mittels Vortexer vermischt und ca. 10 s in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Proben wurden auf die vorbereiteten Säulen im Vakuumbehälter pipettiert. Dazu wurden 300 µl B5 Puffer gegeben und danach ein Vakuum von -0,2 bar über 5 min erzeugt. Im nächsten Schritt wurden 600 µl BW-Puffer hinzugefügt und ein Vakuum von -0,2 bar wurde über 3 min gehalten. Es wurden dann 900 µl B5-Puffer aus dem Kit auf die Säulen pipettiert und ein Vakuum von -0,2 bar über 3 min gehalten. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Dann wurde der Sammelbehälter entfernt, die Säulen zur Trocknung auf ein Filterpapier verbracht, um sie dann in die mit dem sogenannten „Microtube rack“ Einsatz versehene Vakuumpumpe zu überführen. Es folgte eine Trocknungsphase von 5-10 min bei -0,6 bar. Zur Elution der auf der Säule befindlichen DNA wurden Elutionsstrips beschriftet und in die Vakuumkammer unter die Säulen gesetzt. Nun wurden 50 µl BE-Puffer auf die Säulen pipettiert und diese für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Unterdruckphase von -0,6 bar über 2 min. Die Säulen wurden im folgenden Schritt verworfen und die 50 µl gelöste DNA enthaltenden Elutionsstrips bis zur Überführung des Inhaltes in beschriftete 0,5 ml Eppendorfröhrchen maximal 24 h lang im Kühlschrank bei 8 °C gelagert. Danach erfolgte die Lagerung der DNA bei -80 °C.

3.2.2.2 DNA-Isolation mittels Maxwell® 16

Die DNA aller nicht mittels NucleoSpin® behandelten Zecken wurde mittels Maxwell® 16 und Maxwell® 16 LEV Blood Kits extrahiert. Diese Methode der DNA-Isolation basiert auf der Verwendung von paramagnetischen Zellulosepartikeln, die mehr DNA binden können als Trägermaterialien aus Silica. Im Versuch wurde bei jeder Zecke das Scutum mit einer abgeflamten Pinzette abgenommen. Durch die damit geschaffene Öffnung konnte die Proteinase im weiteren Versuchsverlauf eindringen und besser wirken. Die Zecken wurden im Folgenden in beschriftete 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt. Dann wurden 200 µl des im Kit enthaltenen Lysepuffers in die Röhrchen pipettiert und jede Zecke wurde mit einem autoklavierten Pistill zerdrückt. Nach Zugabe weiterer 200 µl Lysepuffer sowie 30 µl der im Kit enthaltenen Proteinase K fand eine Inkubation über 10 min im Thermomixer bei 65 °C

und 1,8×g statt. Dadurch wurden die Zellen aufgeschlossen und die DNA zugänglich gemacht. Daraufhin wurden weitere 200 µl Lysepuffer zur Reaktion gegeben und der gesamte Inhalt des Tubes in die im Kit enthaltene Kartusche gegeben. Im folgenden Schritt wurden 50 µl Elutionspuffer in beschriftete 0,5 ml Eppendorfröhrchen gegeben und diese an entsprechender Stelle im Untersuchungsständer platziert. Für die nun folgende DNA-Isolation wurde das Protokoll für DNA-Isolation aus Blut im Maxwell® Menü ausgewählt. Bei Verunreinigung der Proben durch Magnetkugeln wurden diese über zwei Minuten im MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stand gelagert. Magnetperlen wurden so an den Rand des Eppendorfröhrchens gebracht und die Probe konnte in ein neues Röhrchen pipettiert werden. Die extrahierte DNA wurde bis zu ihrer weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert.

3.2.2.3 Bestimmung des DNA-Gehalts mittels Take 3 Platte im Synergy 4

Die Ermittlung der DNA-Konzentration jeder Probe wurde mittels Bestimmung der optischen Dichte (OD) durch Absorptionsspektrometrie unter Zuhilfenahme der Take 3 Platte im Synergy 4 durchgeführt. Die Software Gen5 wurde dabei verwendet. Es wurden zunächst jeweils 2 µl des bei der Nukleinsäureextraktion verwendeten Elutionsmediums zur Kalibrierung des Gerätes eingesetzt. Je Probe wurden dann 2 µl des DNA-Isolationsproduktes auf die Take 3 Platte pipettiert. Ergebnisse der DNA-Konzentrationsmessung wurden in ng/µl ausgegeben.

Die Konzentration der DNA errechnet sich nach folgender Formel:

$$c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times \text{VF} \times F$$

Dabei steht c für die Konzentration der Ausgangslösung, OD_{260} für die Absorption bei 260 nm, VF für den Verdünnungsfaktor und F für den Multiplikationsfaktor, der sich nach Art der Nukleinsäure ändert, bei dsDNA und einer optischen Weglänge von 1 cm ist der Faktor 50 µg/ml. Das heißt, eine DNA Lösung der Konzentration 50 µg/ml hat eine $\text{OD}_{260}=1$. Zusätzlich lässt sich aus dem Verhältnis der OD_{260} und der OD_{280} der Proteingehalt der Lösung bestimmen, der möglichst gering sein soll, um eine hohe Reinheit der Probe zu erreichen. Eine proteinfreie Lösung hat ein $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Verhältnis von 1,8-2,0 (Mühlhardt, 2009).

Um optimale Bedingungen für die sich anschließende PCR zu schaffen, wurden stark konzentrierte Proben auf einen Nukleinsäuregehalt von 50-140 ng/µl verdünnt. Bei Proben geringer Konzentration wurde entsprechend mehr Template eingesetzt und dieselbe Menge vom in den PCR-Ansatz eingesetzten DEPC-Wasser abgezogen. 20 Proben mit einer Konzentrationsangabe im negativen Bereich sowie einem $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Verhältnis unter 1,5 oder über 2,5 wurden von allen weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

3.2.3 Erregernachweise

Der Nachweis der gesuchten Erreger fand mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) statt. Durch dieses Verfahren wird in der zu untersuchenden DNA nach definierten Genabschnitten gesucht, um diese zu vervielfältigen und später mittels Agarosegelelektrophorese nachzuweisen. Dazu muss die Sequenz, an welche die verwendeten Primer binden sollen, bekannt sein. Die durchzuführenden Schritte sind zunächst die Denaturierung der zu untersuchenden DNA-Doppelstränge bei hoher Temperatur. Es folgt bei geringerer Temperatur das Annealing, damit ist die Bindung der Primer an den komplementären DNA-Abschnitt gemeint. In der folgenden Elongationsphase kann das verwendete Enzym den gebundenen DNA-Abschnitt replizieren. Diese Schritte werden nacheinander in mehreren Zyklen durchlaufen. Durch die hohen Temperaturen, die in der Denaturierungsphase nötig sind, wird sich in der Regel eines hitzestabilen Enzyms, wie beispielsweise der *Taq*-Polymerase bedient (Innis et al., 1988). Um eine möglichst

geringe Kontaminationsgefahr zu gewährleisten, fanden die Erstellung des Mastermixes, der Zusatz der Template-DNA und die Analyse der PCR-Produkte in voneinander getrennten Räumlichkeiten statt.

Für die Durchführung der einzelnen PCR-Untersuchungen wurde eine feste Anzahl zu untersuchender Zecken pro Spezies vorgegeben. Diese wurden bezüglich Geschlecht und Stadium zufällig ausgewählt (Tab. 7).

Tab. 7: Verteilung der zufällig ausgewählten Zecken für die jeweiligen PCR-Untersuchungen

Babesia spp. (18S rDNA-Gen, zum Nachweis eines 602-639 bp langen Abschnittes)				
Stadium/Geschlecht	<i>I. ricinus</i>	<i>I. hexagonus</i>	<i>D. reticulatus</i>	Summe
Weiblich	198	100	147	445
Männlich	2	0	50	52
Nymphen	0	0	0	0
Summe	200	100	197	497
Rickettsia spp. (<i>gltA</i> -Gen, zum Nachweis eines 203 bp langen Abschnittes)				
Stadium/Geschlecht	<i>I. ricinus</i>	<i>I. hexagonus</i>	<i>D. reticulatus</i>	Summe
Weiblich	204	143	177	524
Männlich	1	7	94	102
Nymphen	0	1	1	2
Summe	205	151	272	628
Anaplasmataceae (16S rDNA-Gen, zum Nachweis eines 251 bp langen Abschnittes)				
Stadium/Geschlecht	<i>I. ricinus</i>	<i>I. hexagonus</i>	<i>D. reticulatus</i>	Summe
Weiblich	657	142	0	799
Männlich	112	9	0	121
Nymphen	5	1	0	6
Summe	774	152	0	926
Borrelia spp. (<i>hbb</i> -Gen, zum Nachweis eines 153 bp langen Abschnittes)				
Stadium/Geschlecht	<i>I. ricinus</i>	<i>I. hexagonus</i>	<i>D. reticulatus</i>	Summe
Weiblich	655	142	0	797
Männlich	108	9	0	117
Nymphen	5	1	0	6
Summe	768	152	0	920

3.2.3.1 Klonierung von DNA für die Herstellung von Positivkontrollen

Als Positivkontrolle wurden in jedem PCR-Versuch ein bis zwei Proben statt mit Template-DNA mit 1 µl eines Plasmids versetzt, welches die gesuchte Sequenz enthielt. Plasmide sind zirkuläre dsDNA-Moleküle, die innerhalb von Bakterien jedoch außerhalb der chromosomalen DNA vorkommen und vermehrt werden können. Diese Eigenschaft wird unter anderem genutzt, um Positivkontrollen für PCRs zu erstellen und damit deren Sensitivität in Form von Anzahl an Kopien des gesuchten Genabschnittes zu bestimmen. Die Mehrzahl der als Positivkontrollen genutzten Plasmide wurde dankenswerterweise durch hilfsbereite Kollegen des Instituts für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der Freien Universität zur Verfügung gestellt. Folgende Plasmide wurden im Verlauf dieser Arbeit selbst angefertigt: Plasmid mit Sequenz des *hbb*-Gens von *B. afzelii*, Plasmide mit Sequenzen des *gltA*-Gens (203 bp PCR-Fragment) von *R. raoultii*, *R. prowazekii*, *R. typhi*, *R. akari*, *R. monacensis*, *R. honei* und *R. heilongjiangensis*.

Dazu wurde in einer ersten PCR eine Probe eingesetzt, die die gesuchte Erreger-DNA enthielt. Bei der Klonierung des *hbb* Gens zum Nachweis von *Borrelia* spp. wurde beispielsweise eine Probe genutzt, die DNA von *Borrelia* spp. enthielt, wie vorher durch eine 16S rDNA-spezifische PCR nachgewiesen wurde. In einer PCR mit dem *hbb* Gen als

Zielregion wurde dann der gesuchte DNA-Abschnitt amplifiziert und im Anschluss an die PCR mittels Agarosegelelektrophorese untersucht. Bei passender Bandengröße durch Vergleich mit einem Marker wurde das PCR-Produkt dann nach in Kapitel 3.2.3.12. erläuterten Methoden aufgereinigt.

Für die Klonierungsreaktion wurde mit dem Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit mit One Shot® TOP10 chemisch kompetenten *E. coli* mit folgendem Genotyp gearbeitet: F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80/*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*. Das verwendete Plasmid pCR®-Blunt II-TOPO® enthält zwei Resistenzgene für Kanamycin und Zeocin, zwei Schnittstellen für das im späteren Verlauf verwendete Restriktionsenzym *EcoRI* sowie je eine Bindungsstelle für die M13 forward und reverse Primer (Abb. 5).

Für die Klonierungsreaktion mittels Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit mit One Shot® TOP10 chemisch kompetenten *E. coli* wurden 2 µl aufgereinigtes PCR-Produkt mit 0,5 µl Salt Solution und 0,5 µl pCR®-Blunt II-TOPO® versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit konnte das PCR-Produkt in den Vektor integriert werden. Danach wurde der Reaktionsansatz auf Eis gestellt.

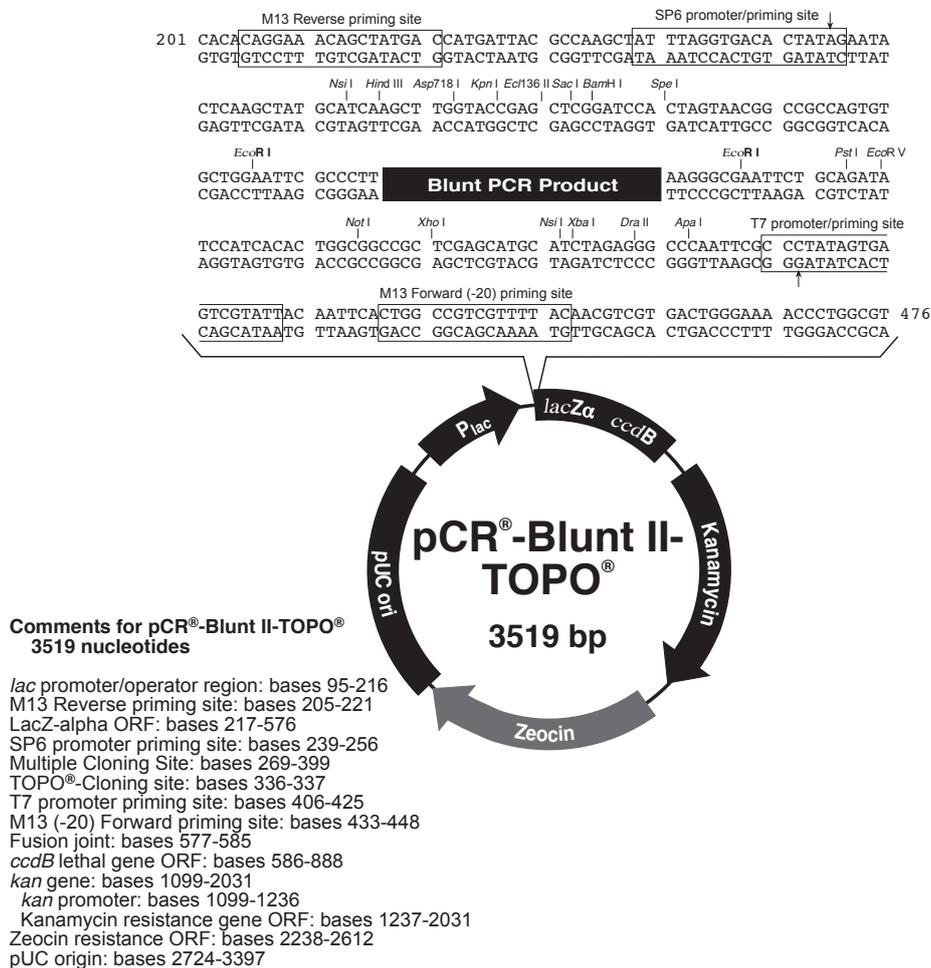


Abb. 5: Vektorkarte pCR-Blunt II-TOPO (www.invitrogen.com)

Es folgte die Transformation der One Shot® TOP10 chemisch kompetenten *E. coli*. Damit ist die Aufnahme des Vektors als Plasmid in die Zellen gemeint. Diese wurden vorher auf Eis aufgetaut, da die Lagerung bei -80 °C erfolgte. Danach wurden 2 µl des Klonierungsansatzes zu den Zellen pipettiert, ein Vermischen erfolgte lediglich mittels Pipettenspitze, um die Zellen nicht zu zerstören. Dieser Ansatz wurde 30 min auf Eis

inkubiert, damit der Vektor sich an die Zellen anlagern konnte. Es folgte ein Hitzeschock des Ansatzes im Wasserbad bei 42 °C für 30 s, wodurch die Aufnahme des Plasmids in einige Zellen ermöglicht wird, und das sofortige Verbringen der Zellen auf Eis. Daraufhin wurden 250 µl S.O.C. Medium, auf 37 °C vorgewärmt, zum Ansatz pipettiert. Das den gesamten Ansatz enthaltende Röhrchen wurde verschlossen und über eine Stunde im Wärmeschrank bei 37 °C und 2,2×g horizontal lagernd geschüttelt.

Bereits vorbereitete Petrischalen enthielten 40 ml LB-Agar, der 50 µl/ml Kanamycin enthielt, was dazu diente, das Wachstum nicht transformierter Keime zu verhindern. Die in der Transformationsreaktion eingesetzten *E. coli* wurden durch den Vektor resistent gegenüber Kanamycin und wurden demzufolge durch das Antibiotikum in ihrem Wachstum nicht beeinträchtigt. Pro Klonierungsansatz wurde eine Platte mit 30 µl der vorbereiteten One Shot® TOP10 chemisch kompetenten *E. coli* belegt, auf eine weitere Platte wurden 270 µl des Ansatzes pipettiert. Der Klonierungsansatz wurde mittels abgeflammten Drigalskispatel auf dem Agar verteilt. Es fand eine Inkubation über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank statt, um die Zellen und darin enthaltenen Plasmide zu vermehren.

Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien zur weiteren Anreicherung der Zellen mittels Pipettenspitze von den Agarplatten in ein flüssiges Nährmedium überführt. Die Pipettenspitzen wurden dazu mittels abgeflammt Pinzette gegriffen, eine Kolonie pro Pipettenspitze wurde in ein beschriftetes Glasröhrchen überführt, das 5 ml LB-Medium mit 50 µl/ml Kanamycin enthielt. Im Regelfall wurden 3 Glasröhrchen pro Klonierungsansatz befüllt und danach bei 37 °C und 2,2×g über Nacht inkubiert.

3.2.3.2 Plasmidisolation

Aus den in Flüssigkultur vorliegenden One Shot® TOP10 chemisch kompetenten *E. coli* wurde mittels NucleoSpin® Plasmid Kit das die Zielsequenz enthaltene Plasmid isoliert. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Der DNA-Gehalt des isolierten Plasmids wurde mittels Take 3 Platte im Synergy 4 ermittelt. Im Anschluss daran fand ein Verdau des Plasmids mittels *EcoRI* statt, um das im Plasmid enthaltene DNA-Fragment im Agarosegel sichtbar machen zu können und seine Größe zu kontrollieren. *EcoRI* ist ein Restriktionsenzym, welches in dem zur Klonierung verwendeten Plasmid an zwei Stellen schneidet, die genau randständig von der Stelle liegen, an der die gesuchte DNA-Sequenz zuvor eingefügt wurde. Das Plasmid hat eine Größe von 3519 bp, das PCR-Produkt der *hbb* PCR eine Größe von 153 bp. Dadurch wandert das kurze DNA-Fragment im Agarosegel weiter als die von ihm getrennte Plasmid-DNA. So kann das gesuchte Fragment vom Plasmid getrennt sichtbar gemacht und der positive Verlauf der Klonierungsreaktion kontrolliert werden. Dazu wurden bei einem DNA-Gehalt von > 100 ng/µl 2 µl 10×Puffer *EcoRI*, 0,5 µl Restriktionsenzym *EcoRI* und 1 µl Plasmid mit 16,5 µl nukleasefreiem Wasser gemischt. Der Restriktionsverdau fand über eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad statt. Bei einem DNA-Gehalt des Plasmids von < 100 ng/µl wurden 2 µl Plasmid eingesetzt und entsprechend nur 15,5 µl nukleasefreies Wasser eingesetzt. An den Verdau schloß sich eine Agarosegelelektrophorese in einem 1%igen Agarosegel an. Je nach Fragmentgröße wurde der passende Marker gewählt, im Falle des *hbb* Gens für *Borrelia* spp. der 100 bp-Marker.

Im folgenden Schritt wurde das eluierte Plasmid zur Sequenzierung in ein externes Labor, GATC Biotech, nach Konstanz geschickt. Es wurde mit M13-Primern sequenziert, für die im Plasmid randständig der gesuchten Sequenz Bindungsstellen vorlagen. Nach Erhalt des Sequenzierungsergebnisses wurde mittels Clonemanager Professional 9 Software nach den bekannten Sequenzen am Randbereich des Plasmid-Inserts gesucht. Die zum Plasmid gehörigen Sequenzbereiche wurden entfernt, so dass nur die ursprünglich gesuchte DNA-Sequenz übrig blieb. Diese konnte mittels Blast® mit Einträgen auf GenBank® verglichen werden, um sicherzugehen, dass die Sequenz auch vom gesuchten Organismus stammte.

Wenn dies der Fall war, konnte eine Verdünnungsreihe des Plasmids für die folgenden PCRs durchgeführt werden.

Durch die mittels Synergy 4 bekannte DNA-Konzentration konnte die genaue Kopienzahl des gesuchten DNA-Abschnitts in der Positivkontrolle berechnet werden und damit wurde bestimmt, wie sensitiv die PCR war. Es ist bekannt, dass der eingesetzte Vektor eine Länge von 2956 bp hat, die Länge des gesuchten PCR-Produkts in bp ist ebenfalls bekannt. Darüber lässt sich die Gesamtlänge des Plasmids berechnen. Der DNA-Gehalt des vorliegenden Klones und die durchschnittliche Masse eines Nukleotids von $109,6 \times 10^{-23}$ g sind ebenfalls bekannt. Darüber lässt sich die Masse des gesamten Plasmids errechnen. Um die Anzahl der Plasmide pro μl zu erhalten wird der DNA-Gehalt durch das Gewicht des Plasmids geteilt, daraus ergibt sich die Anzahl der DNA-Fragmentkopien pro $1 \mu\text{l}$. Nach der Berechnung wurde auf eine Stammlösung von 10^6 Kopien/ μl verdünnt. Diese wurde bei -80°C gelagert. Durch weitere Verdünnung aus der Stammlösung wurde bei jedem neuen PCR-Ansatz eine Lösung mit bekanntem Kopiengehalt erstellt.

3.2.3.3 PCR-Untersuchung auf *Babesia* spp. mittels konventioneller PCR

Als Zielregion für die PCR zum Nachweis von *Babesia* spp. wurde das 18S rDNA-Gen genutzt. Mittels dieser PCR gelingt der Nachweis von allen Erregern der Ordnung Piroplasmida. Das gesuchte Gen ist eine hochkonservierte Region im Genom von Eukaryoten und kodiert für die 18S rRNA als Teil der ribosomalen RNA. Als Vorwärtsprimer wurde ein bereits in der Literatur beschriebener Primer für dieses Gen genutzt (Matijala et al., 2004). Der in dieser Veröffentlichung genannte Rückwärtsprimer wurde modifiziert. Dies diente dem Ausschluss einer Amplifikation von *Hepatozoon* spp. durch das alte Primerpaar. Das gesuchte DNA-Fragment ist je nach Erreger-Spezies 602-639 bp lang.

Die PCR wurde als 25 μl Ansatz durchgeführt, dieser enthielt folgende Komponenten:

16,8	μl	nukleasefreies Wasser
2,5	μl	10 \times Hot Start PCR Puffer
2,5	μl	MgCl ₂ (25 mM)
0,5	μl	dNTP Mix (10 mM)
0,75	μl	RLB-F2 5' GACACAGGGAGGTTAGTGACAAG 3' (10 μM)
0,75	μl	B.mic1075lo 5' AACCCAAAGACTTTGATTTCTCTC 3' (10 μM)
0,2	μl	Maxima [®] Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/ μl)
1,0	μl	Template DNA (50-140 ng/ μl)

Nach einer initialen Denaturierung bei 94°C für 4 min wurden 40 Zyklen des folgenden Protokolls durchlaufen:

15 s	bei 94°C
30 s	bei 63°C
40 s	bei 72°C

Dem folgte eine abschließende Elongationsphase bei 72°C über 10 min sowie eine Kühlung der PCR-Produkte bei 4°C bis zu ihrem weiteren Gebrauch.

Als Positivkontrolle wurden 25 Kopien von einem Plasmid eingesetzt. Die Nachweisgrenze lag in der Verdünnungsreihe bei 10 Kopien. Das Plasmid-Insert aus *Babesia gibsoni* wurde im Vorfeld mit derselben PCR erstellt. Die Negativkontrolle enthielt 1 μl nukleasefreies Wasser.

Die sich an die PCR anschließende Agarosegelelektrophorese fand im 0,8 % Agarosegel statt. Ein 100 bp-Marker wurde zur Kontrolle der Bandengröße aufgetragen. Die PCR wurde wiederholt, wenn die Negativkontrolle eine Bande im positiven Bereich hatte oder die Positivkontrolle keine Bande zeigte.

Alle Banden im positiven Bereich wurden ausgeschnitten und aufgereinigt. Dies geschah nach bereits beschriebener Methode. Aufgereinigte Produkte wurden im externen Labor GATC Biotech sequenziert.

3.2.3.4 PCR-Untersuchung auf *Rickettsia* spp. mittels konventioneller PCR

Zur Untersuchung der Zecken auf Erreger der *Rickettsia* spp. wurden zwei verschiedene PCRs durchgeführt, die beide das *gltA*-Gen nachweisen. Dieses Gen kodiert für die Citratsynthase, die ein wichtiges Enzym im Citratzyklus darstellt. Primer der zuerst durchgeführten PCR hybridisierten mit Erreger-DNA, um einen DNA-Abschnitt einer Länge von 203 bp zu amplifizieren, der nur wenig Basenpaarunterschiede für die Speziesdifferenzierung bieten konnte. Mittels dieser PCR konnten *Rickettsia* spp. der *spotted fever group* nachgewiesen werden. Der 25 µl Ansatz enthielt folgende Komponenten:

15,75 µl	nukleasefreies Wasser
5,0 µl	5× Phusion HF Puffer
0,5 µl	dNTP Mix (10 mM)
1,25 µl	RmasgltA863up 5' GCTAAAGCTAAGGATAAAAATGAT 3' (10 µM)
1,25 µl	RmasgltA1065lo 5' TCAATAAAATATTCATCTTTAAGAGC 3' (10 µM)
0,25 µl	Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase
1,0 µl	Template DNA (50-140 ng/µl)

Als Positivkontrolle wurden 1 µl Plasmid zu 40 Kopien/µl *R. raoulti* für die Untersuchung von 205 *I. ricinus* und 151 *I. hexagonus* verwendet. Die geringste Sensitivität lag in einer durchgeführten Verdünnungsreihe bei 5 Kopien. Für die 275 untersuchten *D. reticulatus* wurde *R. helvetica* als Positivkontrolle gewählt und ebenfalls in einer Menge von 1 µl zu 40 Kopien/µl als Plasmid eingesetzt. Die Negativkontrolle enthielt 1 µl nukleasefreies Wasser. Die folgenden Schritte wurden nach einer 30 s andauernden initialen Denaturierung in 50 Zyklen wiederholt:

30 s bei 98 °C
30 s bei 52 °C
15 s bei 72 °C

Dem folgte eine 5 min andauernde Elongationsphase bei 72 °C und die Kühlung der PCR-Produkte bei 4 °C bis zu ihrer weiteren Verwendung. Im Anschluss an die PCR wurden alle Proben auf 1,5%ige Agarosegele aufgetragen.

Um möglichst viele Basenpaarunterschiede der Erregerspezies in der Sequenzierung nachzuweisen, wurde ein Teil der mittels erster PCR positiv getesteter Proben in einer zweiten PCR zum Nachweis von *Rickettsia* spp. untersucht. Dies betraf 14 Proben von *I. ricinus*, 19 Proben von *I. hexagonus* sowie 12 Proben von *D. reticulatus*. Diese zweite PCR wurde mit demselben Rückwärtsprimer und einem aus der Literatur bekannten Vorwärtsprimer (Roux und Raoult, 2000) durchgeführt. Das untersuchte Gen kodierte wieder für die Citratsynthase, wobei das in dieser PCR nachgewiesene Fragment eine Größe von 676 bp aufwies. Damit sollten *Rickettsien* der *spotted fever group* und der *typhus group* nachgewiesen werden. Für jede PCR wurde ein 25 µl Ansatz mit folgenden Reagenzien erstellt:

16,8 µl	nukleasefreies Wasser
2,5 µl	10× Hot Start PCR Puffer
1,5 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1,25 µl	CS409d 5' CCTATGGCTATTATGCTTGC 3' (10 µM)
1,25 µl	RmasgltA1065lo 5' TCAATAAAATATTCATCTTTAAGAGC 3' (10 µM)
0,5 µl	dNTP Mix (10 mM)
0,2 µl	Maxima® Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)
1,0 µl	Template DNA (50-140 ng/µl)

Die Positivkontrolle (50 Kopien) wurde wie in der ersten PCR für *Rickettsia* spp. beschrieben gewählt, eine Negativkontrolle mit 1 µl nukleasefreiem Wasser wurde mit untersucht. In der Verdünnungsreihe lag die Nachweisgrenze bei 10 Kopien. Im PCR-Cycler fanden nach einer initialen Denaturierung von 4 min Dauer bei 95 °C folgende Schritte in 40 Zyklen statt:

15 s bei 95 °C
30 s bei 53 °C
40 s bei 72 °C

Darauf folgte eine abschließende Elongation für 10 min bei 72 °C und eine Kühlung der Proben bei 4 °C bis zu ihrer weiteren Verwendung. Es folgte eine Agarosegelelektrophorese unter Verwendung eines 0,8%igen Agarosegels. Ein Teil der positiven Banden wurde ausgeschnitten und wie in Kapitel 3.2.3.11 beschrieben aufgereinigt und zur Sequenzierung an das externe Labor GATC Biotech verschickt.

3.2.3.5 Untersuchung auf *Rickettsia* spp. mittels HRM Analyse

Eine weitere Möglichkeit der Speziesdifferenzierung besteht in der Schmelzkurvenanalyse (engl.: „High Resolution Melting Analysis“ – HRM Analyse). Die HRM Analyse ist ein hochauflösendes Verfahren, welches auf der Interkalierung eines Fluoreszenzfarbstoffes, in diesem Falle EvaGreen®, mit doppelsträngiger DNA beruht. In einem ersten Schritt findet eine konventionelle PCR statt, doppelsträngige DNA wird vermehrt. Dabei lagert sich der Farbstoff in die Doppelstrangmoleküle ein und generiert durch seine Bindung ein Fluoreszenzsignal. In einem zweiten Schritt findet eine kontinuierliche Erhitzung und dadurch Aufschmelzung der DNA-Doppelstränge statt. Hierbei löst sich der verwendete Farbstoff von der DNA und das Fluoreszenzsignal geht verloren. Dieser Vorgang lässt sich im entsprechenden Gerät in Echtzeit nachverfolgen. Je nach Basenabfolge wird eine unterschiedliche Schmelzkurve generiert. Diese ändert sich bei abweichender Basenabfolge und geringfügige Mutationen können nachgewiesen werden (Wittwer et al., 2003). Die hohe Auflösung wird durch den Einsatz eines sättigenden Farbstoffes möglich gemacht, da dieser sämtliche Bindungsstellen der dsDNA besetzt und ein durch Aufschmelzung der Doppelstränge freiwerdendes Farbstoffmolekül keine bisher freigebliebenen Bindungsstellen besetzen kann.

Um eine HRM durchzuführen, wurden Positivkontrollen der einzelnen *Rickettsia* spp. gebraucht. In diesem Fall wurden sie freundlicherweise von der veterinärmedizinischen Fakultät in Utrecht zur Verfügung gestellt. Positivkontrollen für *R. helvetica* und *R. raoulti* lagen bereits vor, Plasmide von *R. prowazekii*, *R. typhi*, *R. akari*, *R. monacensis*, *R. honei* und *R. heilongjiangensis* wurden aus den Utrechter Blutproben über Klonierung hergestellt und zur Kontrolle bei GATC in Konstanz sequenziert. Schmelzkurvenanalysen unter Einsatz aller Positivkontrollen wurden durchgeführt, um Unterschiede im Schmelzkurvenmuster zu erkennen. Dazu wurden jeweils 1000 Kopien/µl der einzelnen Plasmide als Template-DNA in den folgenden 25 µl PCR-Ansatz eingesetzt:

15,35	µl	nukleasefreies Wasser
5,0	µl	5× Phusion HF Puffer
0,5	µl	dNTP Mix (10 mM)
1,25	µl	RmasgltA863up 5' GCTAAAGCTAAGGATAAAAAATGAT 3' (10 µM)
1,25	µl	RmasgltA1065lo 5' TCAATAAAATATTCATCTTTAAGAGC 3' (10 µM)
0,25	µl	Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase
0,4	µl	EvaGreen®
1,0	µl	Template DNA

Das Temperaturprotokoll für den CFX96™ Real-Time System Cycler belief sich nach einer 30 s andauernden Denaturierung bei 98 °C auf folgende Schritte, die in 50 Zyklen durchlaufen wurden:

98 °C über 10 s
52 °C über 30 s
72 °C über 15 s

Daran schloss sich ohne Übergang eine stufenweise Erhitzung an, wobei die Temperatur um 0,1 °C/s bis 95 °C stieg. Entstandene Schmelzkurvenmuster wurden mittels Precision Melt Analysis™ Software ausgewertet. Es wurde keine Verdünnungsreihe zur Bestimmung der geringsten Sensitivität durchgeführt.

3.2.3.6 Untersuchung auf *Rickettsia* spp. mittels Sonden-HRM Analyse

Als weitere Methode zur Speziesdifferenzierung wurde eine HRM Analyse unter Einsatz von Sonden durchgeführt. Dabei wurden im Anschluss an jede HRM Analyse mit bereits genanntem Temperaturprotokoll zwei weitere unter Einsatz je einer der beiden Sonden durchgeführt. Dabei wurde das Prinzip der asymmetrischen PCR genutzt (Sanchez et al., 2004). Das Primerpaar der ersten HRM Analyse wird in einem ungleichen Verhältnis eingesetzt, sodass viele Einzelstrangmoleküle entstehen. An diese setzt sich im zweiten Lauf die jeweils eingesetzte Sonde, der Fluoreszenzfarbstoff lagert sich an die vielen kurzen Doppelstränge und die weniger häufigen langen Doppelstränge an. Bei der Auswertung der Schmelzkurve sollten sich zwei Schmelzpeaks zeigen, wobei einer vom kurzen DNA-Doppelstrang ausgehen sollte und der andere vom längeren. Die Sonden wurden so gewählt, dass sie einen Bereich im Fragment abdeckten, der viele Basenunterschiede in den unterschiedlichen *Rickettsia* spp. bereithielt. Über den Verlauf des ersten Schmelzpeaks, der zum kurzen Fragment gehört, könnte die Erregerspezies bestimmt werden. Durchgeführt wurde diese Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an die oben beschriebene HRM Analyse im CFX96™ Real-Time System Cyler. Für jede der beiden Sonden wurde ein 25 µl Ansatz erstellt, der folgende Bestandteile enthielt:

15,1	µl	nukleasefreies Wasser
1,25	µl	Sonde 887-918 oder Sonde 982-1010 (je 0,5 µM)
5,0	µl	5× Phusion HF Puffer
0,5	µl	dNTP Mix (10mM)
0,25	µl	RmasgltA863up 5' GCTAAAGCTAAGGATAAAAATGAT 3' (10 µM)
1,25	µl	RmasgltA1065lo 5' TCAATAAAATATTCATCTTTAAGAGC 3' (10 µM)
0,25	µl	Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase
0,4	µl	EvaGreen®
1,0	µl	Template DNA

Als Template- DNA wurde 1 µl des Produktes aus dem ersten HRM-Lauf eingesetzt, es wurde keine Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Sensitivität durchgeführt. Das Temperaturprotokoll unterschied sich nicht vom ersten HRM-Lauf. Die Schmelzkurven wurden im Anschluss durch Precision Melt Analysis™ Software analysiert.

3.2.3.7 PCR-Untersuchung auf Anaplasmataceae mittels konventioneller PCR

Über die konventionelle PCR zum Nachweis von *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. und *Cand. Neoehrlichia* wurde das 16S rDNA-Gen nachgewiesen, welches für ribosomale RNA kodiert. Dazu verwendete Primer stammten aus der Literatur (Tabar et al., 2008), wobei eine Modifikation in Form eines Austausches der letzten Base des Vorwärtsprimers durch Cytosin oder Thymin vorgenommen wurde. Diese letzte Base bindet somit Guanin bzw. Adenin. Durch diese Modifikation wird ein breiteres Spektrum an Zielsequenzen abgedeckt. Das gesuchte Fragment hatte eine Größe von 251 bp.

Jede PCR enthielt im 25 µl Ansatz folgende Reagenzien:

17,5	µl	nukleasefreies Wasser
2,5	µl	10× Hot Start PCR Puffer
1,5	µl	MgCl ₂ (25 mM)
0,75	µl	A/Efor 5' GGGGATGATGTCAARTCAGCAY 3' (10 µM)
0,75	µl	A/Erev 5' CACCAGCTTCGAGTTAAGCCAAT 3' (10 µM)
0,75	µl	dNTP Mix (10 mM)
0,25	µl	Maxima [®] Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/ µl)
1,0	µl	Template DNA (50-140 ng/µl)

Die Positivkontrolle, die umgerechnet 40 Kopien/µl des zu untersuchenden Genbereiches für *Anaplasma phagocytophilum* enthielt, wurde für jeden PCR-Ansatz neu verdünnt eingesetzt. Die Sensitivität betrug in den Verdünnungsreihen 20 Kopien. Das Temperaturprotokoll für den PCR-Cycler wurde nach einer initialen Denaturierungsphase von 95 °C für 5 m in 40 Zyklen durchlaufen:

30 s bei 94 °C
30 s bei 60 °C
30 s bei 70 °C

Daran schloss sich eine Elongationsphase von 7 min bei 72 °C an. Das Resultat der PCR wurde anschließend im 1,5%igen Agarosegel durch Elektrophorese überprüft.

3.2.3.8 Untersuchung auf Anaplasmatataceae mittels HRM Analyse

Die HRM wurde mit den gleichen Primern durchgeführt, die auch für die konventionelle PCR verwendet wurden. Ein 25 µl Ansatz enthielt folgende Bestandteile:

16,1	µl	nukleasefreies Wasser
5,0	µl	5× Phusion HF Puffer
0,75	µl	A/Efor 5' GGGGATGATGTCAARTCAGCAY 3' (10 µM)
0,75	µl	A/Erev 5' CACCAGCTTCGAGTTAAGCCAAT 3' (10 µM)
0,75	µl	dNTP Mix (10 mM)
0,25	µl	Phusion [®] Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase
0,4	µl	EvaGreen [®]
1,0	µl	Template DNA (50-140 ng/µl)

Nach initialer Denaturierung bei 98 °C für 30 s wurden folgende Schritte in 50 Zyklen durchlaufen:

15 s bei 98 °C
30 s bei 60 °C
30 s bei 72 °C

Im Anschluss daran wurde die Temperatur von 72 °C schrittweise mit 0,6 °C/min auf 95 °C gesteigert. Die PCR und der anschließende Schmelzvorgang wurden im CFX96™ Real-Time System durchgeführt. Positivkontrollen (1000 Kopien) eines Plasmids von *A. phagocytophilum* und *Cand. Neoehrlichia mikurensis* wurden parallel mitgeführt, wobei die Detektionsgrenze 100 Kopien betrug. Die generierten Schmelzkurven wurden im Anschluss an den Versuch mittels Precision Melt Analysis™ Software ausgewertet.

3.2.3.9 PCR-Untersuchung auf *Borrelia* spp. mittels konventioneller PCR

Die durchgeführte PCR diente dem Nachweis des *hbb* Gens (Portnoi et al., 2006) und der Differenzierung der *Borrelia* spp. auf Speziesebene. Die Nachweisgrenze dieser PCR betrug 5 Kopien. Verwendete Primer wiesen ein Gen nach, welches für ein Histon-bindendes

Protein kodiert. Das amplifizierte Fragment hatte eine Größe von 153 bp. Die PCR wurde im 20 µl Ansatz durchgeführt und enthielt folgende Reagenzien:

12,4	µl	nukleasefreies Wasser
4,0	µl	5× Phusion HF Puffer
0,4	µl	dNTP Mix (10 mM)
1,0	µl	hbb640 5' GTAAGGAAATTAGTTTATGTCTTT 3' (10 µM)
1,0	µl	hbbBw 5' TAAGCTCTTCAAAAAAAGCATCTA 3' (10 µM)
0,2	µl	Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase
1,0	µl	Template DNA (50-140 ng/µl)

Die Proben durchliefen nach initialer Denaturierung über 30 s bei 98 °C 40 Zyklen des folgenden Temperaturprotokolls:

5 s	bei 98 °C
30 s	bei 57 °C
10 s	bei 72 °C

Darauf folgte eine abschließende Elongationsphase von 5 min bei 72 °C, die von einer Kühlung der Proben bei 4 °C bis zu ihrer weiteren Verwendung gefolgt wurde.

Ein Teil der positiven Proben wurde bei GATC in Konstanz sequenziert. Bei 14 von 80 Proben fiel keine Identität zu bekannten Sequenzen von *Borrelia* spp. für das *hbb* Gen auf. Da nicht für alle *Borrelia* spp. Sequenzen des *hbb* Gens in GenBank® hinterlegt waren, wurden zwei der fraglichen 14 Proben mit identischer Sequenz mittels einer weiteren PCR untersucht, um eine nähere Charakterisierung der Erreger durchzuführen. Die dafür verwendete PCR wurde mit Primern durchgeführt, die das 16S rDNA Gen amplifizieren (Richter et al., 2003). Es handelte sich um eine nested PCR. Demzufolge bestand diese aus zwei PCR-Läufen und wurde unter Nutzung von zwei Primerpaaren durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass selbst sehr geringe Mengen an Template-DNA nachgewiesen werden können. Eine erste PCR wird gefolgt von einer zweiten, bei der die verwendeten Primer auf einem Bereich zwischen den zuerst verwendeten Primern liegen. Dadurch werden unspezifisch amplifizierte Produkte der ersten PCR nicht weiter vermehrt (Mühlhardt, 2009). In dieser PCR wurde dabei ein 600 bp großes Fragment nachgewiesen, die Sensitivität dieser PCR wurde nicht getestet. Der erste 25 µl Ansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

16,85	µl	nukleasefreies Wasser
5,0	µl	5× Phusion HF Puffer
0,4	µl	dNTP Mix (10 mM)
0,75	µl	16S1A 5' CTAACGCTGGCAGTGCGTCTTAAGC 3' (10 µM)
0,75	µl	16S1B 5' AGCGTCAGTCTTGACCCAGAAGTTC 3' (10 µM)
0,25	µl	Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase
1,0	µl	Template DNA (50-140 ng/µl)

Das Temperaturprotokoll für den PCR-Cycler lief nach einer einminütigen Denaturierungsphase bei 94 °C folgendermaßen ab:

20 s	bei 94 °C
20 s	bei 63 °C
40 s	bei 72 °C

Diese drei Schritte wurden in 50 Zyklen durchlaufen, daran schlossen sich eine Elongationsphase von 2 min bei 72 °C sowie eine Kühlung der Proben auf 4 °C bis zu ihrer weiteren Verwendung an.

Im nächsten Arbeitsschritt folgte die PCR unter Zuhilfenahme des inneren Primerpaares. Als Template-DNA wurde jeweils 1 µl der Produkte der ersten PCR eingesetzt. Die sich anschließende PCR bestand im 25 µl Ansatz aus folgenden Reagenzien:

16,85	µl	nukleasefreies Wasser
5,0	µl	5× Phusion HF Puffer
0,4	µl	dNTP Mix (10 mM)
0,75	µl	16S2A 5' AGTCAAACGGGATGTAGCAATAC 3' (10 µM)
0,75	µl	16S2B 5' GGTATTCTTTCTGATATCAACAG 3' (10 µM)
0,25	µl	Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase
1,0	µl	Template DNA (Produkt der ersten PCR)

Das Temperaturprotokoll wurde wie in der oben beschriebenen PCR mit dem äußeren Primerpaar gewählt, es unterschied sich lediglich in der Annealing-Temperatur, die hier 56 °C betrug sowie in der Länge der Elongationsphase, die sich auf 30 s belief. Im Anschluss an die zweite PCR wurden die Produkte auf ein 0,8 % Agarosegel aufgetragen. Die beiden positiven Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und zur Sequenzierung an GATC versandt.

3.2.3.10 Agarosegelelektrophorese

Im Anschluss an jede PCR fand eine Agarosegelelektrophorese statt. Dies diente der Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe durch Anlegen einer Spannung. Durch die mit dem verwendeten Laufpuffer negative Ladung der DNA wandert diese bei Anlegen einer Spannung durch das Agarosegel vom negativen zum positiven Pol. Die Agarose vernetzt sich im Gel und bildet je nach Konzentration unterschiedlich große Poren, durch die die DNA wandert (Mühlhardt, 2009). Für größere DNA-Fragmente wurden niedriger konzentrierte Agarosegele benutzt, da der Widerstand im Gel für die wandernden DNA-Fragmente sonst zu hoch wäre. Für die hier durchgeführten Versuche wurde, je nach Größe des untersuchten DNA-Fragmentes, ein 0,8-1,5 % Agarose enthaltendes Gel gegossen (Tab. 8). TAE-Puffer wurde mit der entsprechenden Menge Agarose versetzt und aufgekocht, um die Agarose zu lösen. Dem zubereiteten Gel wurde 0,01 % GrGreen zugesetzt und es wurde in einen mit entsprechendem Kamm ausgestatteten Gelschlitten gebracht und mit TAE-Puffer überschichtet. Durch ein Netzgerät wurde eine Spannung von 3-4 V/cm erzeugt, um die DNA der Größe nach aufzutrennen. Loading Dye 6× wurde im Verhältnis 1:6 zu jeder Probe gegeben bevor diese in die Geltasche pipettiert wurde. In jedem Gel lief mindestens ein Marker der entsprechenden Größe mit, um die DNA-Fragmentgröße abzuschätzen.

Tab. 8: Verwendete Agarosekonzentration je nach Fragmentgröße

Agarosekonzentration	Fragmentgröße
0,8 %	400 bp – 8 kbp
1 %	250 bp – 6 kbp
1,5 %	100 bp – 3 kbp

3.2.3.11 Aufreinigung von PCR-Produkten

Proben, die ein positives PCR-Ergebnis zeigten und zur weiteren Speziesdifferenzierung mittels Sequenzierung untersucht werden sollten, wurden wie folgt behandelt: Positive Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in eine 1000 µl Filter-Pipettenspitze in einem 2 ml Eppendorfröhrchen gebracht. Dieses wurde im folgenden Schritt für 10 min bei

8200×g zentrifugiert und der Durchfluss mit 1 µl Glycogen RNA Grade versetzt. Das enthaltene Flüssigkeitsvolumen wurde mittels Pipette gemessen und Natriumacetat im Verhältnis 1:10 sowie Isopropanol im Verhältnis 1:1 zugesetzt. Nach einer Durchmischung der Bestandteile durch Schwenken des Röhrchens wurde dieses für mindestens 3 h bei -20 °C eingelagert, um eine Fällung der DNA zu erreichen. Nach der Fällung wurde bei 4 °C und 60.500×g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das am Boden des Röhrchens erhaltene Pellet mit 1000 µl 75 % Ethanol versetzt. Daran schloß sich eine erneute Zentrifugation bei 4 °C und 60.500×g über eine Zeit von 15 min an. Der Überstand wurde verworfen und noch verbliebenes Ethanol abpipettiert. Das Pellet wurde in 22 µl nukleinsäurefreiem Wasser gelöst. Vor der Versendung zu ihrer Sequenzierung in einem externen Labor wurde der DNA-Gehalt jeder Probe mittels Agarosegelelektrophorese und unter Einsatz des Lambda DNA/EcoRI+HindIII Markers geschätzt.

PCR-Produkte, die nicht mittels oben beschriebener Fällung behandelt wurden, konnten mittels DNA Clean & Concentrator™ – 5 nach Herstellerangaben aufgereinigt werden. Dafür wurde abschließend mit 25 µl nukleasefreiem Wasser eluiert.

Ein weiteres Kit, das High Pure PCR Product Purification Kit, wurde ebenfalls zur Aufreinigung nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde ein Elutionsvolumen von 35 µl gewählt.

3.2.3.12 Sequenzierung

Die Sequenzierung fand in einem externen Labor bei GATC Biotech AG in Konstanz statt. Dazu wurden je 20 µl der zu untersuchenden Probe mit einem DNA-Gehalt von 50-100 ng/µl und 20 µl der entsprechenden Primer einer Konzentration von 10 µM versendet. Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden die Standard-Primer M13forward und M13reverse genutzt. Ermittelte Daten konnten im Folgenden mittels Clonemanager professional 9 und BioEdit Software (Hall, 1999) ausgewertet werden, um sie später mittels BLAST® Software (Altschul et al., 1990) näher zu charakterisieren und bestimmten Erregern zuzuordnen.

3.2.4 Statistische Auswertung

Ermittelte Daten wurden mit Hilfe von Microsoft® Excel® dokumentiert. Statistische Berechnungen wurden mittels R Software unter Zuhilfenahme der Software-Pakete „Epidemiological Tools“ (Fay und Feuer, 1997) und „Linear mixed-effects models using S4 classes“ (Schwarz, 1978) durchgeführt.

Dabei wurden Zusammenhänge zwischen Koinfektionen zweier Erreger mittels Mid-P Exakt Test bestimmt. In Fällen in denen der Mid-P Exakt Test nicht angewendet werden konnte, wurden Signifikanzen mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests und des Fisher-Exakt Tests ermittelt. Für Koinfektionen mit drei Erregern wurde der Mid-P Exakt Test nur gegenüber einer Referenzkategorie angewendet. Um Zusammenhänge in der gesamten Kreuztabelle zu bestimmen, wurden der Chi-Quadrat-Test und der Fisher-Exakt Test angewendet.

P-Werte für das Geschlecht der Zecken, die Zeckenart und die Infektion einer Zecke wurden mittels Mid-P Exakt Test, Fisher-Exakt Test sowie Chi-Quadrat-Test berechnet, dabei galt als Signifikanzwert $p < 0,05$.

Über ein gemischtes Modell („generalized linear mixed model“) wurden Zusammenhänge zwischen Infektion einer Zecke, Felllänge des Hundes, Größe des Hundes, Geschlecht des Hundes, Geschlecht der Zecke sowie Zeckenart berechnet. In einer zweiten Berechnung wurden diese Zusammenhänge für dieselben Faktoren statt mit der Größe des Hundes mit der Rasse des Hundes berechnet.

Der Zusammenhang zwischen dem SI und der Infektion einer Zecke wurde über den t-Test ermittelt.

3.2.5 Phylogenetische Auswertung

Ein Verwandtschaftsbaum für *Borrelia* spp. bezüglich des *hbb* Gens wurde unter Zuhilfenahme von Clustal X (Larkin et al., 2007) berechnet. Dazu wurde ein "Alignment" der Nukleinsäuresequenzen unter Standardeinstellungen durchgeführt. Das beste Nukleotidaustausch-Modell wurde mit Jmodeltest 0.1 (Posada, 2008) unter der Annahme von acht Substitutionsraten-Kategorien bestimmt. Schließlich wurde ein Verwandtschaftsbaum mittels PhyML 3.0.1 (Guindon und Gascuel, 2003) unter der Verwendung des Modells TPM3uf berechnet. Die Substitutionsraten wurden wie im Jmodeltest berechnet und auf $A \rightarrow C = C \rightarrow G = 42.62375$, $A \rightarrow G = C \rightarrow T = 409.92731$ und $A \rightarrow T = G \rightarrow T = 409.92731$ festgesetzt. Die Anzahl der Substitutionsraten-Kategorien wurde auf acht Γ verteilte Kategorien festgelegt und Γ wurde durch PhyML berechnet. Die Anzahl der invariablen Positionen und die Nukleotidfrequenzen wurden ebenfalls durch PhyML berechnet. Die Berechnung des besten Baumes wurde mit 5 zufälligen und einem "neighbour joining tree" begonnen und am Ende nur der wahrscheinlichste Baum berücksichtigt. Der Statistische Support für die einzelnen Verzweigungen wurde sowohl mit dem nach Shimodaira-Hasegawa modifizierten "approximate likelihood ratio" Test als auch mit einer Bayesianischen Transformation des "approximate likelihood ratio" Tests berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Berechnungen zum Scutal Index

4.1.1 Dauer der Blutmahlzeit

Der SI wurde bei 1695 von 1728 Zecken bestimmt. Der Median für den SI von 647 weiblichen *I. ricinus* betrug 3,0, der Mittelwert lag bei 3,6, der kleinste ermittelte SI lag bei 1,4 und der größte bei 9,5. Für 481 vermessene weibliche *D. reticulatus* wurde ein Median von 2,4 und ein Mittelwert von 3,5 ermittelt. Der kleinste und größte gemessene Wert betrug 1,0 respektive 8,5. Für *D. reticulatus* und *I. ricinus* lagen Daten vor, die eine Korrelation zwischen dem SI und der Dauer der Blutmahlzeit in Tagen herstellten (Dautel et al., 2006). Daher ließ sich eine grobe Aussage über die Dauer der Blutmahlzeit in Tagen machen (Abb. 6).

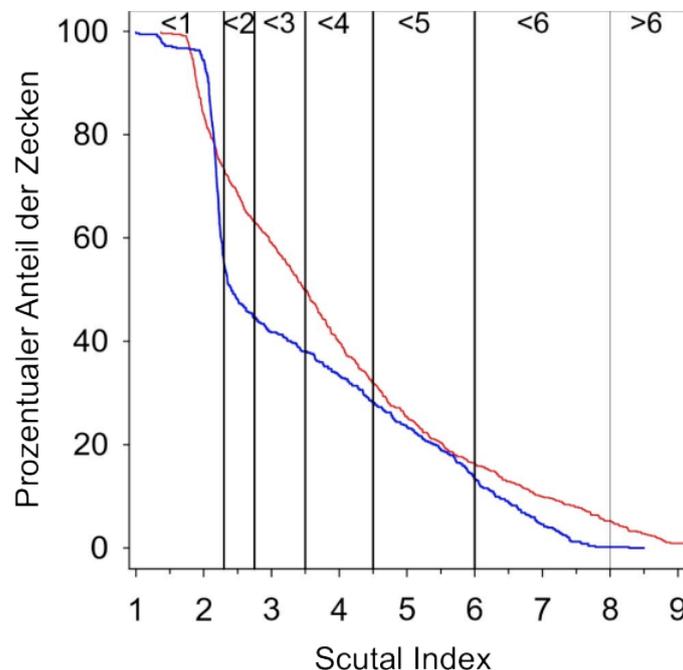


Abb. 6: Prozentualer Anteil der weiblichen Zecken, die mindestens den entsprechenden SI auf der x-Achse aufweisen. In rot *I. ricinus*, in blau *D. reticulatus* dargestellt. Die senkrechten Linien bringen den jeweiligen SI mit der Dauer der Blutmahlzeit in Tagen in Zusammenhang (Dautel et al., 2006). Bsp: Etwa 40 % von *D. reticulatus* wiesen einen SI von >3 auf, dies entspricht einer Dauer des Saugaktes zwischen 2 und 3 Tagen.

Der Vergleich der gemessenen SIs mit den Werten aus Tab. 5 (2.7.2) macht deutlich, dass über 40 % von *D. reticulatus* (n=480) und über 60 % von *I. ricinus* (n=647) erst nach einer mindestens über zweitägigen Blutmahlzeit der Zecken durch die Hundebesitzer gefunden und entfernt wurden (Abb. 6). Im Median waren weibliche *D. reticulatus* 2 Tage lang und *I. ricinus* 3 Tage lang mit der Blutmahlzeit beschäftigt, bevor sie entdeckt und entfernt wurden. *I. hexagonus* wurde nicht betrachtet, da in der Literatur keine Vergleichswerte für den SI dieser Zeckenart vorlagen.

4.1.2 Unterschiede bezüglich Spezies und Geschlecht der Zecken

Die Unterschiede der SIs weiblicher und männlicher Zecken waren signifikant ($p < 0,001$). Bei Vergleich von Zecken desselben Geschlechts aber unterschiedlichen Genus mittels Kruskal-Wallis Test und Dunn's post hoc Test fanden sich signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) nur zwischen weiblichen *D. reticulatus* und *I. hexagonus* sowie männlichen *I. ricinus* und *D. reticulatus* (Abb. 7).

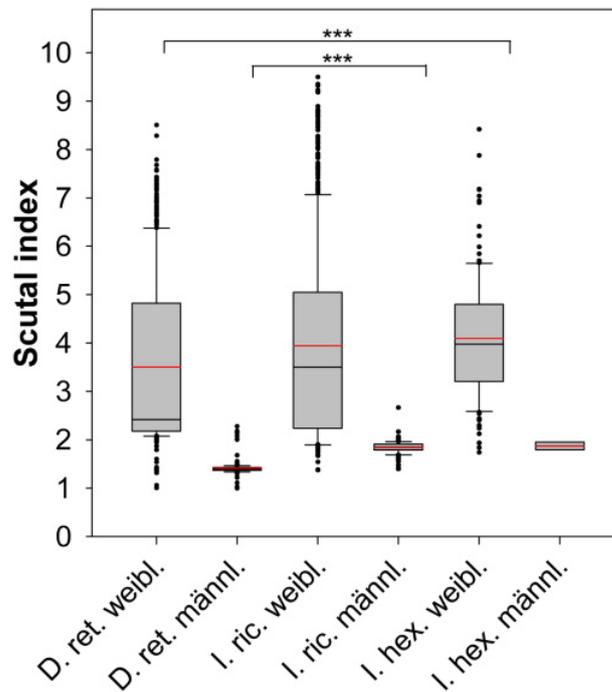


Abb. 7: SIs männlicher (männl.) und weiblicher (weibl.) Zecken im Vergleich. *** Signifikante Unterschiede mit $p < 0,001$ zwischen *D. reticulatus* (*D. ret.*) männlich und *I. ricinus* (*I. ric.*) männlich sowie zwischen *D. reticulatus* weiblich sowie *I. hexagonus* (*I. hex.*) weiblich. Median und Mittelwert als schwarze und rote horizontale Linie

4.1.3 Einfluss der Felllänge der Hunde auf den Scutal Index der Zecken

Zu Beginn der Vorgängerstudie wurden teilnehmende Hunde durch Angaben ihrer Besitzer in Gruppen bezüglich ihrer Felllänge, „kurz“, „mittel“ und „lang“, eingestuft. Über die Durchnummerierung jeder Zecke konnte der Bezug zum befallenen Hund hergestellt und so eine Zuordnung der Zecken in die o. g. Gruppen durchgeführt werden. Die Hypothese, dass Zecken an Hunden mit langem Fell später gefunden werden, sollte damit geprüft werden. Der Vergleich der drei Gruppen mittels Kruskal-Wallis Test und Dunn's Test für Post-hoc-Vergleiche untereinander ließ lediglich eine Tendenz zum höheren Median des SI in der Gruppe „lang“ im Vergleich zu den Gruppen „kurz“ und „mittel“ erkennen (Abb. 8). Erst bei einer weiteren Unterteilung der Zecken in ihre Spezies ließ sich ein signifikanter Unterschied des Medians ($p < 0,05$) bei *D. reticulatus* in Gruppe „lang“ im Vergleich zu Gruppen „kurz“ und „mittel“ erkennen (Abb. 9). Somit traf die These, dass Zecken an Hunden mit langem Fell später gefunden werden, lediglich für die Spezies *D. reticulatus* zu.

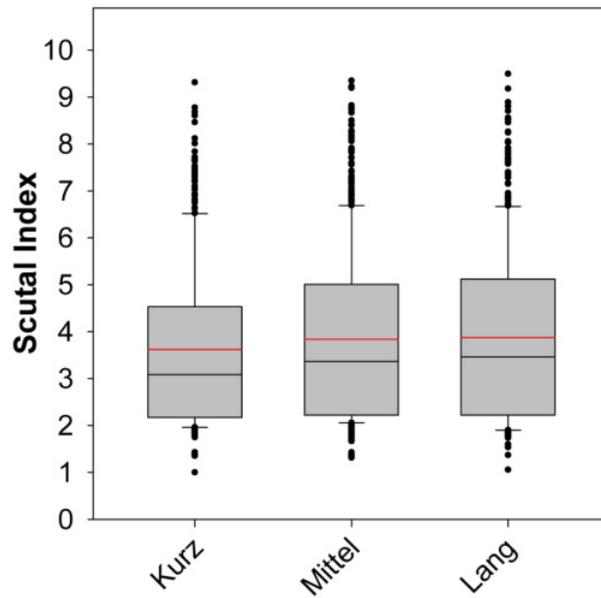


Abb. 8: Vergleich des SI weiblicher Zecken in den Gruppen „Kurz“, „Mittel“ und „Lang“. Mittelwert und Median sind als rote bzw. schwarze horizontale Linie dargestellt. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Median der SIs der einzelnen Gruppen erkennen.

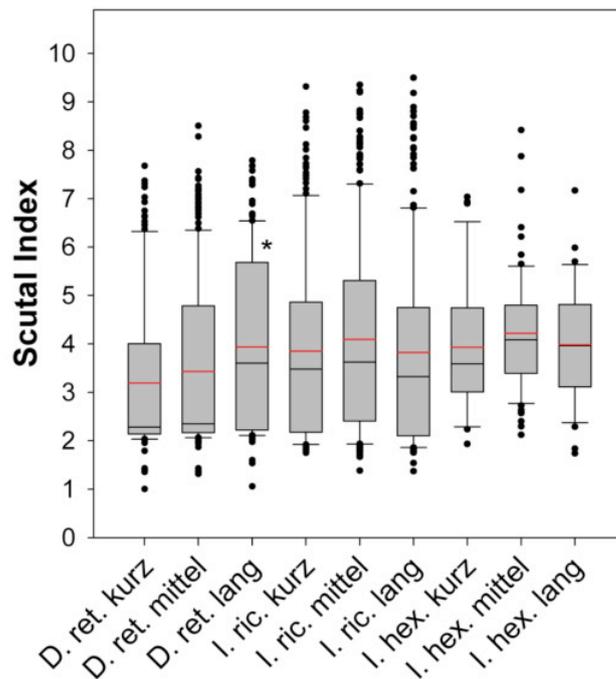


Abb. 9: Vergleich der SIs weiblicher Zecken der drei Spezies *D. reticulatus* (*D. ret.*), *I. ricinus* (*I. ric.*) und *I. hexagonus* (*I. hex.*) in den Gruppen „kurz“, „mittel“ und „lang“. * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis Test und Dunn's Test für post hoc Vergleiche. Mittelwert und Median als rote bzw. schwarze horizontale Linie dargestellt.

4.2 Prävalenzen

4.2.1 *Babesia* spp.

Die PCR-Untersuchungen auf *Babesia* spp. ergaben die in Tab. 9 aufgeführten Prävalenzen.

Tab. 9: Prävalenzen von *Babesia* spp. in Berliner Zecken mit 95 % Konfidenzintervall (KI).

Spezies	Prävalenz absolut	Prävalenz relativ (%)	KI (%)
<i>I. ricinus</i> (n=200)	5	2,5	0,92-5,45
<i>I. hexagonus</i> (n=100)	3	3	0,77-7,95
<i>D. reticulatus</i> (n=197)	0	0	0,00-1,51

Die 5 positiven Proben von *I. ricinus* konnten durch die Sequenzierung folgenden Spezies zugeordnet werden: 3 *B. microti* (1,5 %, KI: 0,38-4,03 %), 1 *B. venatorum* (0,5 %, KI: 0,02-2,33 %) und 1 *B. capreoli* (0,5 %, KI: 0,02-2,33 %).

Die drei positiven *I. hexagonus* ergaben durch die Sequenzierung den Nachweis von *B. venatorum* (3 %, KI: 0,77-7,95 %).

4.2.2 *Rickettsia* spp.

Die in Tab. 10 aufgeführten Prävalenzen wurden durch eine von zwei zum Nachweis von *Rickettsia* spp. durchgeführten PCRs ermittelt (siehe S. 43). Da die PCR zur Speziesdifferenzierung bei Einsatz von Proben-DNA eine geringe Sensitivität aufwies, wurde eine andere PCR mit höherer Sensitivität zur Ermittlung der Prävalenzen vorgeschaltet. So wurden die in Tab. 10 aufgeführten Prävalenzen durch die PCR, die 203 bp des *gltA*-Gens amplifizierte, erhoben. Die darauf folgende Speziesdifferenzierung erfolgte mit einer PCR, die 676 bp desselben Gens amplifizierte.

Tab. 10: Prävalenzen von *Rickettsia* spp. in Berliner Zecken mit 95 % Konfidenzintervall (KI).

Spezies	Prävalenz absolut	Prävalenz relativ (%)	KI (%)
<i>I. ricinus</i> (n=205)	125	61,0	54,2-67,5
<i>I. hexagonus</i> (n=151)	67	44,4	36,6-52,4
<i>D. reticulatus</i> (n=272)	107	39,3	33,7-45,2

Eine weitere Nachweismöglichkeit sollte mittels HRM und Sonden-HRM durchgeführt werden. Diese Untersuchung zeigte für alle untersuchten Positivkontrollen einen Schmelzkurvenverlauf. Die Schmelzpunkte der eingesetzten Genospezies (*R. prowazekii*, *R. monacensis*, *R. honei*, *R. heilongjiangensis*, *R. raoulti*, *R. helvetica*) lagen jedoch sehr eng beieinander, daher war keine klare Differenzierung im Schmelzverhalten möglich. Deshalb fand die Speziesdifferenzierung von einer Auswahl der als *Rickettsia* spp. positiv detektierten Proben mittels konventioneller PCR statt. Durch sie wurde das 676 bp lange PCR-Produkt

gewonnen, das für die Speziesdifferenzierung im externen Labor verwendet werden konnte. Die Speziesdifferenzierung von 16 untersuchten Proben von *I. ricinus* erbrachte für alle den Nachweis von *R. helvetica* (39,3%). In 19 zur Speziesdifferenzierung untersuchten *I. hexagonus* wurden 1 *R. raoulti* (2,3 %), 2 *R. monacensis* (4,7 %) und 16 *R. helvetica* (37,4 %) nachgewiesen. Alle 12 untersuchten Proben von *D. reticulatus* ergaben den Nachweis von *R. raoulti* (39,3 %).

4.2.3 *Anaplasma* spp.

Von *I. ricinus* wurden zunächst 774 Proben mittels konventioneller PCR untersucht. Positive Proben wurden dann entweder mittels Sequenzierung im externen Labor oder über die Schmelzkurvenanalyse (HRM) untersucht. Für die Speziesdifferenzierung wurden 43,2 % (35 Proben) der positiven *I. ricinus* ausschließlich mittels Sequenzierung bestätigt, 13,6 % (11 Proben) ausschließlich über die HRM und 45,7 % (37 Proben) über beide Verfahren bestimmt. Die Untersuchung mittels beider Verfahren war nötig, um die neue Methode der HRM für diese PCR zu evaluieren. Die Übereinstimmung zwischen HRM- und Sequenzierungsergebnissen für die untersuchten Zeckenproben betrug 100 % (n= 37). Für *I. hexagonus* fanden sowohl der Nachweis der gesuchten Erreger als auch die Speziesdifferenzierung allein über die HRM statt. Die Speziesdifferenzierung ergab in unterschiedlichen Verhältnissen den Nachweis der Erreger *A. phagocytophilum* und *Cand. Neoehrlichia mikurensis* (siehe Tab. 11). *D. reticulatus* wurde nicht untersucht, weil parallel ebenfalls aus dem Berliner Raum stammende *D. reticulatus* in einem anderen Projekt nur in 2 von 2000 Zecken *A. phagocytophilum* DNA gefunden wurde (M. Kohn, unveröffentlicht).

Tab. 11: Prävalenzen von Anaplasmatataceae bei Berliner Zecken mit 95 % Konfidenzintervall (KI).

Spezies	Anaplasmatataceae			<i>A. phagocytophilum</i>			<i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>		
	Absolut	%	KI (%)	Absolut	%	KI (%)	Absolut	%	KI (%)
<i>I. ricinus</i> (n=774)	83	10,7	8,7-13,0	50	6,5	4,9-8,4	33	4,3	3,0-5,9
<i>I. hexagonus</i> (n=152)	15	9,9	5,8-15,4	6	3,9	1,6-8,0	9	5,9	2,9-10,6

In Abb. 10 sind im Verlauf der HRM generierte Amplifikationsplots, Schmelzkurven und Differenzgrafiken für eine Auswahl von Proben positiv für *A. phagocytophilum* oder *Cand. Neoehrlichia mikurensis* sowie für eine koinfizierte Probe abgebildet. Die Probe, die eine Koinfektion enthielt, wurde freundlicherweise von Herrn D. Maaz am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin in Berlin zur Verfügung gestellt. In den Grafiken werden relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) dem Amplifikationszyklus (A) oder der gemessenen Temperatur (B und C) gegenübergestellt. Eine klare Unterscheidung zwischen beiden Spezies mittels Schmelzkurven und Differenzplots ist möglich. Die koinfizierte Probe fällt durch einen deutlich niedrigeren Schmelzpunkt auf. Dies lässt sich daran erkennen, dass die Schmelzkurve in (B) und (C) eine Linksverschiebung aufweist.

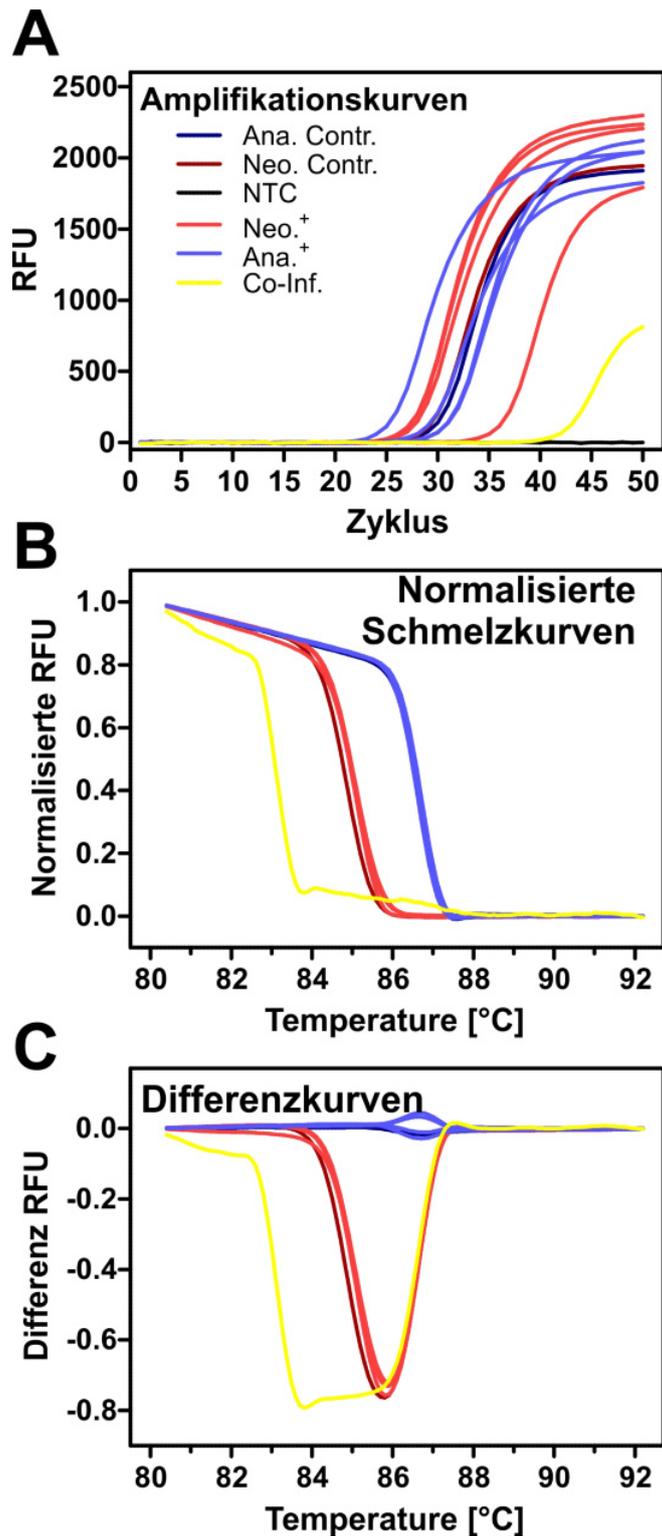


Abb. 10: HRM-PCR zur Unterscheidung von *A. phagocytophilum* und *Cand. Neoehrlichia mikurensis*. (A) Amplifikationskurven acht verschiedener Zeckenproben, die positiv für *A. phagocytophilum* (Ana.⁺) oder *Cand. Neoehrlichia mikurensis* (Neo.⁺) sind, mit einer koinfizierten Milzprobe von *Apodemus agrarius* (Co-Inf.), Positivkontrollen (Ana. Contr., Neo. Contr.) und einer no-template-Kontrolle (NTC), die statt Probenmaterial mit nukleasefreiem Wasser versetzt wurde. (B) Normalisierte Schmelzkurven desselben Datensatzes. (C) Differenzkurven desselben Datensatzes. Der Mittelwert des Fluoreszenzsignals von *A. phagocytophilum*-positiven Proben subtrahiert von allen anderen Einzelproben.

4.2.4 *Borrelia* spp.

Die PCR zum Nachweis des *hbb* Gens von *Borrelia* spp. wurde bei 768 *I. ricinus* und 152 *I. hexagonus* durchgeführt (Tab. 12). *D. reticulatus* wurde nicht untersucht.

Tab. 12: Prävalenzen von *Borrelia* spp. in Berliner Zecken mit 95 % Konfidenzintervall (KI).

Spezies	Prävalenz absolut	Prävalenz relativ (%)	KI (%)
<i>I. ricinus</i> (n=768)	89	11,6	9,5-14,0
<i>I. hexagonus</i> (n=152)	17	11,2	6,9-17,0

Die Sequenzierung von 67 *I. ricinus* ergab den Nachweis von 13 *B. afzelii* (2,3 %), 19 *B. garinii* (3,3 %), 24 *B. burgdorferi* s.s. (4,2 %) und 11 *B. turicatae* zuzuordnenden Proben (1,9 %).

Sequenzierungen 13 positiver Proben von *I. hexagonus* ergaben den Nachweis von 3 *B. afzelii* (2,6 %), 2 *B. garinii* (1,7 %), 5 *B. burgdorferi* s.s. (4,3 %) und 3 (2,6%) mit hoher Ähnlichkeit zu *Borrelia turicatae*.

B. turicatae ist in Amerika als Erreger des Rückfallfiebers bekannt. Da in Europa die mit *B. turicatae* verwandte Spezies *B. miyamotoi* vorkommt, lag die Vermutung nahe, diese Zecken könnten mit *B. miyamotoi* infiziert sein, da für diese Spezies noch keine *hbb* Gensequenz in der Datenbank Genbank[®] hinterlegt war. Deshalb wurde eine PCR mit dem 16S rDNA-Gen als Zielregion zur Bestätigung der Spezies durchgeführt. Die Sequenz von *B. miyamotoi* bezüglich dieses Gens wurde bereits veröffentlicht (Richter et al., 2003). Die gewählte nested-PCR wurde bei zwei der 14 Proben durchgeführt und verlief positiv. Erhaltene PCR-Produkte lieferten Sequenzierungsergebnisse für *B. miyamotoi*. Da die restlichen 12 Sequenzen für das *hbb* Gen identisch sind, gelten sie ebenfalls als *B. miyamotoi*-positiv. Die durch die Sequenzierung erhaltene Sequenz von 105 Basenpaaren wurde in der Datenbank des „European Bioinformatics Institute“ (www.ebi.ac.uk) unter der Zugangsnummer HE993870 veröffentlicht. Die Berechnung eines Verwandtschaftsbaums mit der gewonnenen Sequenz für *B. miyamotoi* und anderen aus GenBank[®] heruntergeladenen Sequenzen für das *hbb* Gen wurde durchgeführt (Abb. 11). *B. miyamotoi* weist laut des berechneten Verwandtschaftsbaums eine enge Verwandtschaft zu den beiden weiteren Erregern des Rückfallfiebers (*B. turicatae*, *B. parkeri*) auf. Eine weitere Verwandtschaftseinheit bildet die Gruppe der anderen aufgeführten Erreger, die *Borrelia burgdorferi* s.l. angehören.

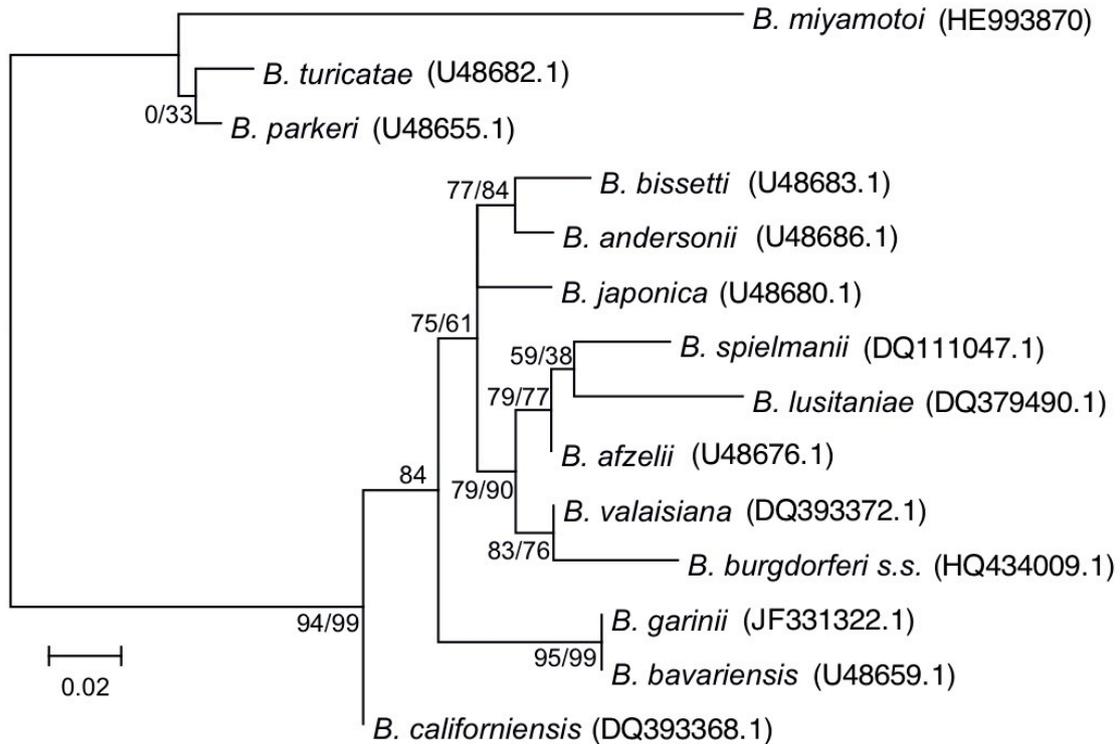


Abb. 11: Verwandtschaftsbaum von *Borrelia* spp. für das *hbb* Gen, Zugangsnummern von Genbank® in Klammern hinter jeweiligem Speziesnamen. Die verwendete Sequenz für *B. miyamotoi* entstammt der aktuellen Studie und wurde auf www.ebi.ac.uk veröffentlicht.

4.2.5 Koinfektionen

4.2.5.1 *I. ricinus*

Bei 20 % (KI: 14,5-26,52 %) der auf alle Erreger untersuchten *I. ricinus* (n=170) lagen Koinfektionen mit zwei oder drei Erregern vor (Abb. 12). Es wurden Koinfektionen mit *Rickettsia* spp./ *Borrelia* spp. (8 %, KI: 4,76-13,12 %), *A. phagocytophilum*/*Rickettsia* spp. (5 %, KI: 2,61-9,49 %), *Cand. Neoehrlichia mikurensis*/*Rickettsia* spp. (2 %, KI: 0,75-5,58 %), *Babesia* spp./*Rickettsia* spp. (2 %, KI: 0,45-4,73 %) *Cand. Neoehrlichia mikurensis*/*Rickettsia* spp./*Babesia* spp. (1 %, KI: 0,03-2,87 %), *A. phagocytophilum*/*Rickettsia* spp./*Borrelia* spp. (1 %, KI: 0,20-3,83 %) sowie für *Cand. Neoehrlichia mikurensis*/*Rickettsia* spp./*Borrelia* spp. (1 %, KI 0,03-2,87 %) nachgewiesen. Die Gesamtinfektionsrate der 170 auf alle Erreger untersuchten *I. ricinus* betrug 65 % (KI: 57,90-72,17 %).

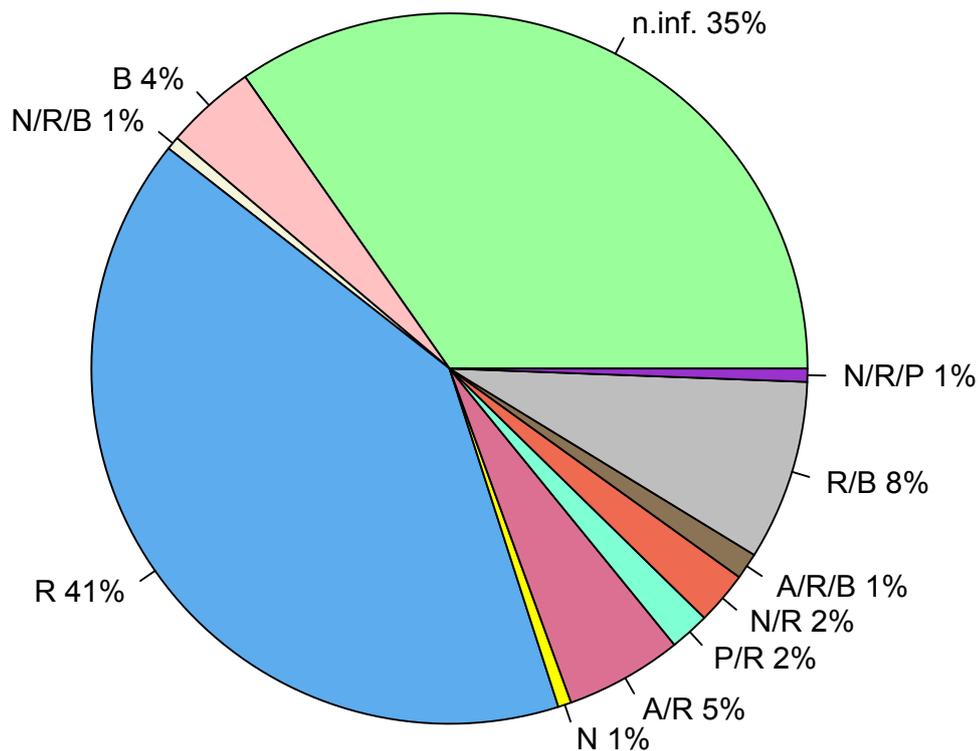


Abb. 12: Infektionen und Koinfektionen von *I. ricinus* mit *Borrelia* spp. (B), *Rickettsia* spp. (R), *A. phagocytophilum* (A), *Cand. Neoehrlichia mikurensis* (N), *Babesia* spp. (P) und nicht infizierte (n.inf.) *I. ricinus*. Die Einzelerregerinfektionen sind abzüglich der Proben dargestellt, die in die Koinfektionen eingehen.

4.2.5.2 *I. hexagonus*

In 15 % (KI: 8,98-23,02 %) der 100 auf alle Erreger untersuchten *I. hexagonus* ließen sich Koinfektionen nachweisen (Abb. 13). Nachgewiesene Koinfektionen waren *Cand. Neoehrlichia mikurensis/Babesia* spp. (1 %, KI: 0,05-4,83 %), *Babesia* spp./*Rickettsia* spp. (4 %, KI: 1,28-9,37 %), *Rickettsia* spp./*Borrelia* spp. (6 %, KI: 2,47-12,06%), *A. phagocytophilum/Rickettsia* spp. (1 %, KI: 0,05-4,83 %), *Cand. Neoehrlichia mikurensis/Borrelia* spp. (1%, KI: 0,05-4,83 %), *Cand. Neoehrlichia mikurensis/Rickettsia* spp. (2 %, KI: 0,34-6,45 %). Die Gesamtinfektionsrate der 100 auf alle Erreger untersuchten *I. hexagonus* betrug 59 % (KI: 49,17-68,32 %).

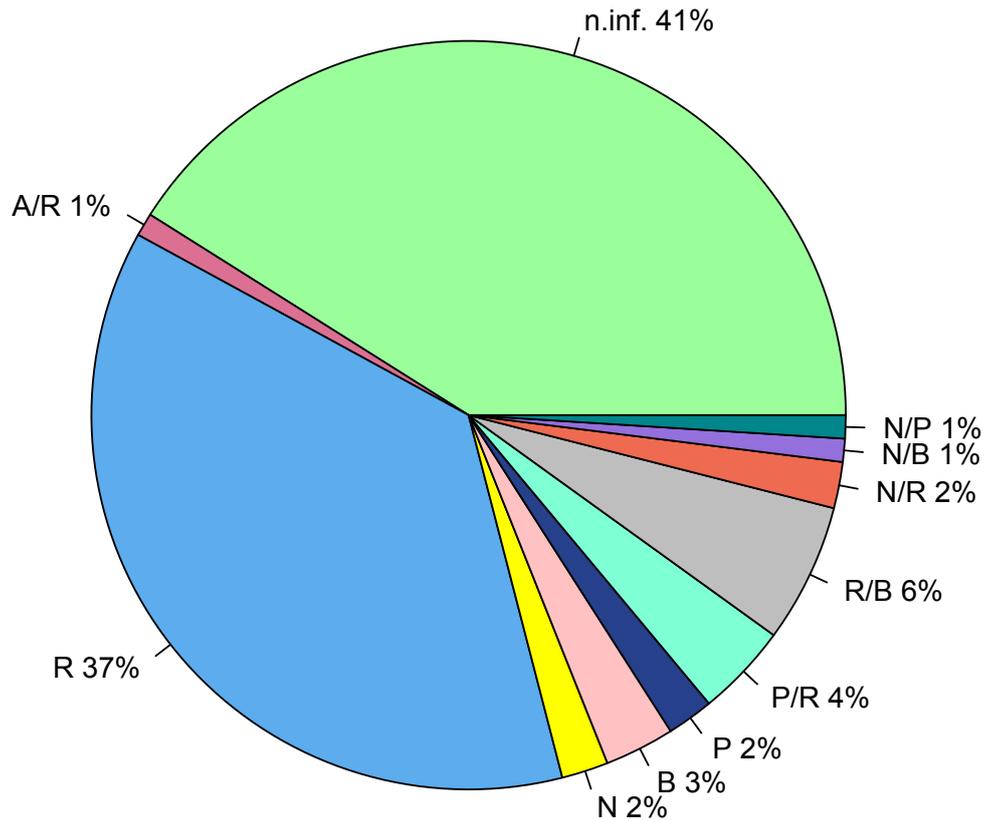


Abb. 13: Infektionen und Koinfektionen von *I. hexagonus* mit *Borrelia* spp. (B), *Rickettsia* spp. (R), *A. phagocytophilum* (A), *Cand. Neoehrlichia mikurensis* (N), *Babesia* spp. (P) und nicht infizierte (n.inf.) *I. hexagonus*. Die Einzelerregerinfektionen sind abzüglich der Proben dargestellt, die in die Koinfektionen eingehen.

4.2.5.3 *D. reticulatus*

In 140 der auf *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp. untersuchten *D. reticulatus* (Abb. 14) war keine Koinfektion nachzuweisen (KI 0,00-2,12 %). Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch die Untersuchung dieser Zeckenspezies auf die beiden Erregergruppen *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp. lediglich *Rickettsia* spp. nachgewiesen wurde und die Infektionsrate für *Babesia* spp. in *D. reticulatus* demnach bei 0% (KI 0,00-1,51) lag. Die Gesamtinfektionsrate der 140 auf beide Erreger untersuchten *D. reticulatus* betrug 64 % (KI: 55,36-71,23).

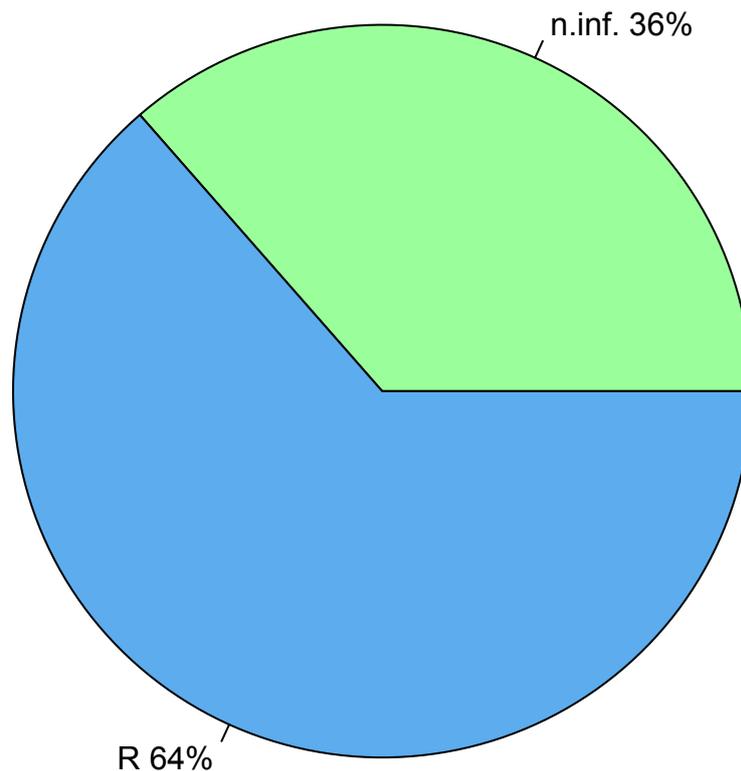


Abb. 14: Infektionen von *D. reticulatus* mit *Rickettsia* spp. (R) und nicht infizierte (n.inf.) *D. reticulatus*.

4.3 Berechnete Zusammenhänge bezüglich der Infektion einer Zecke

4.3.1 Koinfektionen bei *I. ricinus* und *I. hexagonus*

Für die statistische Berechnung von Zusammenhängen wurde mittels Mid-P Exakt Test gearbeitet. Wenn dieser nicht verwendet werden konnte, wurden Zusammenhänge mittels Chi-Quadrat-Test und Fisher-Exakt Test berechnet. Zunächst wurden die statistischen Zusammenhänge bei einer Koinfektion von *I. ricinus* mit zwei Erregern geprüft. Die Berechnung des Zusammenhangs zwischen der Infektion mit *A. phagocytophilum* und einer Infektion mit *Rickettsia* spp. mittels Mid-P Exakt Test ergab einen mit $p < 0,05$ und einem Odds Ratio von > 6 signifikanten Zusammenhang. Daraus geht hervor, dass bei *I. ricinus*, die mit *A. phagocytophilum* infiziert sind, eine höhere Wahrscheinlichkeit besteht, dass sie auch mit *Rickettsia* spp. infiziert sind, als bei *I. ricinus*, die keine Infektion mit *A. phagocytophilum* aufweisen. Für *Cand. Neoehrlichia mikurensis* und *Rickettsia* spp. war der Zusammenhang, der ebenfalls mittels Mid-P Exakt Test berechnet wurde, nicht signifikant. Auch der mittels Chi-Quadrat-Test und Fisher-Exakt Test berechnete Zusammenhang zwischen Infektionen mit *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp. war statistisch nicht signifikant. Dieselbe Aussage lässt sich für die Berechnung des Zusammenhangs einer Infektion mit *Rickettsia* spp. und *Borrelia* spp. durch Mid-P Exakt Test machen.

Die Berechnung der Zusammenhänge von Koinfektionen mit drei Erregern mittels Chi-Quadrat-Test und Fisher-Exakt Test bestätigten die oben aufgeführten Ergebnisse: Zusammenhänge zwischen Infektionen mit *Cand. Neoehrlichia mikurensis*, *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp. waren statistisch nicht signifikant. Dasselbe galt für *Cand. Neoehrlichia*

mikurensis, *Rickettsia* spp. und *Borrelia* spp. Lediglich bei der Berechnung des Zusammenhangs für die Kombination *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. und *Borrelia* spp. ließ sich, ähnlich wie bei Koinfektionen mit zwei Erregern, ein signifikanter Zusammenhang ($p < 0,005$) für Infektionen mit *A. phagocytophilum* und *Rickettsia* spp. erkennen.

Die Berechnung der Zusammenhänge zwischen Infektionen mit zwei Erregern bei *I. hexagonus* wurde mittels Mid-P Exakt Test für die Kombinationen *A. phagocytophilum/Rickettsia* spp, *Cand. Neoehrlichia mikurensis/Rickettsia* spp., *Babesia* spp./*Rickettsia* spp. und *Borrelia* spp./*Rickettsia* spp. durchgeführt. Die Zusammenhänge der Kombinationen *Cand. Neoehrlichia mikurensis/Babesia* spp. und *Cand. Neoehrlichia mikurensis/Borrelia* spp. wurden mittels Fisher-Exakt Test sowie Chi-Quadrat-Test berechnet. Es ließen sich für Koinfektionen in *I. hexagonus* keine statistisch signifikanten Zusammenhänge erkennen.

4.3.2 Durch Zecken oder Hunde beeinflusste Faktoren

4.3.2.1 Durch Zecken beeinflusste Faktoren

Die Berechnung des Zusammenhangs zwischen der Zeckenart und der Wahrscheinlichkeit einer vorliegenden Infektion erfolgte über den Mid-P Exakt Test mit *I. hexagonus* als Bezugsgröße. Es konnte ein signifikanter Unterschied der Zeckenarten untereinander festgestellt werden. So ist die Wahrscheinlichkeit, dass *I. hexagonus* infiziert ist, größer als die einer Infektion von *D. reticulatus* ($p < 1,8 \times 10^{-11}$, Odds Ratio 0,13) oder einer Infektion von *I. ricinus* ($p < 0,002$, Odds Ratio 0,39).

Der rechnerische Vergleich zwischen Geschlechtern der Zecken in Bezug auf die Infektion konnte nicht durchgeführt werden, da nicht ausreichend Zecken des männlichen Geschlechts auf alle Erreger untersucht wurden, die Schnittmenge betrug in diesem Fall $n=36$. Die Infektionsrate der weiblichen Zecken betrug 64 % ($n=241$).

Die auf alle Erreger untersuchten Zecken, getrennt nach Spezies und Geschlecht/Stadium sind in Tab. 13 aufgeführt.

Tab. 13: Auf Anaplasmataceae, *Babesia* spp., *Borrelia* spp. und *Rickettsia* spp. untersuchte *I. ricinus* und *I. hexagonus* sowie auf *Babesia* spp. und *Rickettsia* spp. untersuchte *D. reticulatus*.

Geschlecht/Stadium	<i>I. ricinus</i>	<i>I. hexagonus</i>	<i>D. reticulatus</i>	Summe
Weiblich	169	100	105	374
Männlich	1	0	35	36
Nymphen	0	0	0	0
Summe	170	100	140	410

4.3.2.2 Durch Zecken und Hunde beeinflusste Faktoren

Im gemischten Modell wurde der Zusammenhang der Infektion von adulten Zecken mit verschiedenen durch Hunde oder Zecken beeinflussten Faktoren berechnet. Dazu zählten die Felllänge, das Geschlecht, die Rasse und die Größe der Hunde sowie Geschlecht und Art der Zecken. Da die Größe der Hunde nachträglich gemäß FCI (Federation Cynologique Internationale) und nur für Rassehunde ($n=283$) bestimmt wurde, sind für Mischlinge ($n=157$) keine Angaben zur Größe gegeben. Deshalb sind zwei Rechnungen durchgeführt worden. Die erste berücksichtigte nur Felllänge, Geschlecht und Rasse der Hunde sowie Geschlecht und Art der Zecken in Bezug auf eine Infektion. In einer zweiten Berechnung wurde statt der Rasse der Hunde die Größe einbezogen und nur Hunde, denen eine Felllänge zugeordnet

werden konnte, wurden betrachtet. Dabei ließen sich keine hundebezogenen Signifikanzen feststellen. Lediglich für durch Zecken beeinflusste Faktoren wurden Signifikanzen für folgende Zusammenhänge ermittelt: *I. hexagonus* sind im Vergleich zu *D. reticulatus* und *I. ricinus* häufiger infiziert ($p < 2,2 \times 10^{-7}$ bzw. $p < 0,005$).

4.3.3 Anzahl der für jeden Hund abgegebenen infizierten Zecken

Um zu untersuchen, ob Zecken sich durch die Blutmahlzeit am Hund infiziert haben könnten, wurden die gesammelten Daten nach Anzahl abgegebener infizierter Zecken pro Hund geordnet. Von 172 (39%) der 441 Hunde wurden 2 oder mehr abgegebene Zecken auf Erreger untersucht. Hunde, von denen mehr als 13 infizierte Zecken stammten, wurden einzeln betrachtet. Dabei wurden nur die Zecken gewertet, die laut Besitzerangaben gestochen hatten oder mindestens einen SI von 2,31 (entspricht 2 Tagen Blutmahlzeit) aufwiesen. Es handelte sich dabei um vier Hunde.

Vom ersten Hund stammten 15 infizierte von insgesamt 24 Zecken, dies entspricht einer Infektionsrate von 63 %. Alle von diesem Hund abgegebenen Zecken konnten *Ixodes* spp. zugeordnet werden. Davon waren 10 Stück (42 %) mit *Rickettsia* spp. infiziert, 3 Zecken (13 %) waren mit Anaplasmataceae und 5 Zecken (21 %) mit *Borrelia* spp. infiziert. Für *Rickettsia* spp. und Anaplasmataceae bewegen sich die Prävalenzen in einer ähnlichen Größenordnung wie in den insgesamt untersuchten Zecken (39,3-44,4 % bzw. 9,9-10,7 %). Lediglich für *Borrelia* spp. fällt eine ca. doppelt so hohe Prävalenz der vom Hund abgesammelten Zecken im Vergleich zur Prävalenz in den insgesamt untersuchten Zecken (11,2-11,6 %) auf. Dies gibt einen Hinweis auf eine vorliegende Infektion des Hundes mit *Borrelia* spp..

Vom zweiten Hund stammten 15 infizierte von 35 (43 %) abgegebenen Zecken. Die 35 abgegebenen Zecken unterteilten sich in 17 *Ixodes* spp. und 18 *D. reticulatus*. Von 15 auf *Rickettsia* spp. untersuchten *D. reticulatus* wurden 6 (40 %) positiv getestet. Für auf dieselben Erreger untersuchten *Ixodes* spp. ergab sich der Nachweis einer Infektion in 7 von 13 (54 %) Proben. Weiterhin waren 3 der 16 untersuchten *Ixodes* spp. (19 %) mit Anaplasmataceae infiziert. Auffällig ist damit eine leicht höhere Prävalenz von *Rickettsia* spp. bei *Ixodes* spp. im Vergleich zur Prävalenz bei den insgesamt untersuchten *Ixodes* spp. (39,3-44,4%). Die Prävalenz von *Ixodes* spp. bezüglich der Anaplasmataceae übersteigt deutlich die Prävalenz der insgesamt untersuchten Zecken für den Erreger (9,9-10,7 %).

Einem dritten Hund konnten insgesamt 13 infizierte von 22 abgegebenen Zecken (60 %) zugeordnet werden. Alle von diesem Hund abgegebenen Zecken waren *Ixodes* spp.. Darunter fielen 10 (45 %) mit *Borrelia* spp. infizierte Zecken auf, außerdem wurden in 6 von 11 (55 %) untersuchten Zecken *Rickettsia* spp. nachgewiesen. Bei diesem Hund ist die erhöhte Prävalenz der an mit *Rickettsia* spp. infizierten Zecken im Vergleich zur Prävalenz der insgesamt untersuchten Zecken (39,9-44,4 %) auffällig. Noch deutlicher unterscheidet sich die Prävalenz jedoch für *Borrelia* spp.. Hier fällt eine ungefähr vierfach erhöhte Prävalenz im Vergleich zur Prävalenz der Gesamtzahl der untersuchten Zecken (11,2-11,6 %) auf. Auch bei diesem Hund ist eine Infektion mit *Borrelia* spp. vorstellbar.

Dem vierten Hund, der durch eine hohe Anzahl abgegebener infizierter Zecken auffiel, konnten 14 infizierte von 56 (25 %) abgegebenen Zecken zugeordnet werden. Es handelte sich um 27 *Ixodes* spp. und 29 *D. reticulatus*. Unter den untersuchten *Ixodes* spp. waren 8 (30 %) mit Anaplasmataceae und 2 von 25 (8 %) untersuchten Zecken mit *Borrelia* spp. infiziert. Bei *D. reticulatus* wurden 2 von 16 (13 %) untersuchten Zecken positiv für *Rickettsia* spp. getestet. Die Abweichungen in Bezug auf die Prävalenz der insgesamt untersuchten Zecken sind in Form von niedrigen Prävalenzen für *Borrelia* spp. und *Rickettsia* spp. im Vergleich zu denen der insgesamt untersuchten Zeckenzahl vorhanden. Für die auf Anaplasmataceae untersuchten *Ixodes* spp. übersteigt die Prävalenz die der insgesamt

untersuchten Zecken (9-10 %) um ein dreifaches, ein Indiz für eine Infektion des Hundes mit Anaplasmatataceae.

4.3.4 Zusammenhang von Scutal Index und Infektion

Mit einem oder mehreren Erregern infizierte Zecken weisen im Mittelwert einen höheren SI auf als nicht infizierte. Dieser Zusammenhang ist laut Berechnung mittels t-Test statistisch signifikant ($p < 2,2 \times 10^{-7}$) mit $n=450$ infizierten und $n=798$ nicht infizierten Zecken. Die Kurve für nicht infizierte Zecken (Abb. 15 A) verläuft spitz und erreicht ein Maximum bei einem SI von 2 (entspricht einer Dauer der Blutmahlzeit von ca. 1 Tag). Der Median des SI beträgt bei den nicht infizierten Zecken 2,2, der Mittelwert liegt bei 3,0.

Die Kurve für infizierte Zecken (Abb. 15 B) dagegen verläuft deutlich flacher und besitzt ein Plateau in einem Bereich des SI von 2-5 (entspricht einer Dauer der Blutmahlzeit von 1-5 Tagen). Sie ist im Vergleich zur Kurve für nicht infizierte Zecken deutlich nach rechts verschoben. Der Median des SI für infizierte Zecken beträgt 3,6, der Mittelwert 3,9. Im Zuge der Berechnung der Dichtekurven wurden die Beobachtungen geglättet. Dadurch lässt sich in Abb. 15 der Eindruck erwecken, dass es Zecken gab, deren SI über 10 lag. Dieser Wert kam nicht vor, sondern kam durch die Kerndichteschätzung zustande. Die sieben Nymphen waren in dieser Untersuchung ausgeschlossen.

Um zu untersuchen, wie hoch der Anteil an Zecken war, die sowohl Erreger-DNA enthielten als auch lange Zeit Blut am Hund sogen, wurden positiv getestete weibliche *I. ricinus* und *D. reticulatus* nach ihrem SI in zwei Gruppen unterteilt (Tab. 14). Ein Grenzwert von mindestens 2,31 wurde gewählt, denn dieser SI entspricht einer mindestens zweitägigen Blutmahlzeit. Dies ist die mindestens benötigte Zeitspanne für eine Übertragung von Erregern dieser Studie (siehe Kapitel 2.7.1). Dabei wurden Anteile von 9 % für weibliche *I. ricinus* mit Anaplasmatataceae, 8 % mit *Borrelia* spp., 54 % mit *Rickettsia* spp. und 2 % mit *Babesia* spp. ermittelt. Weibliche *D. reticulatus* mit einem SI von mindestens 2,31 waren zu einem Anteil von 20 % mit *Rickettsia* spp. infiziert.

Ein Vergleich der Erregerprävalenzen aus beiden Gruppen ($SI < 2.31$ bzw. $SI \geq 2.31$) sollte zeigen, dass weibliche Zecken, die längere Zeit Blut gesaugt haben mit höherer Wahrscheinlichkeit Erreger-DNA enthalten. Diese Hypothese konnte gestützt werden, denn die Anteile an positiv getesteten weiblichen Zecken in der Gruppe mit einem $SI \geq 2.31$ waren signifikant höher (p -Werte in Tab. 14 aufgeführt).

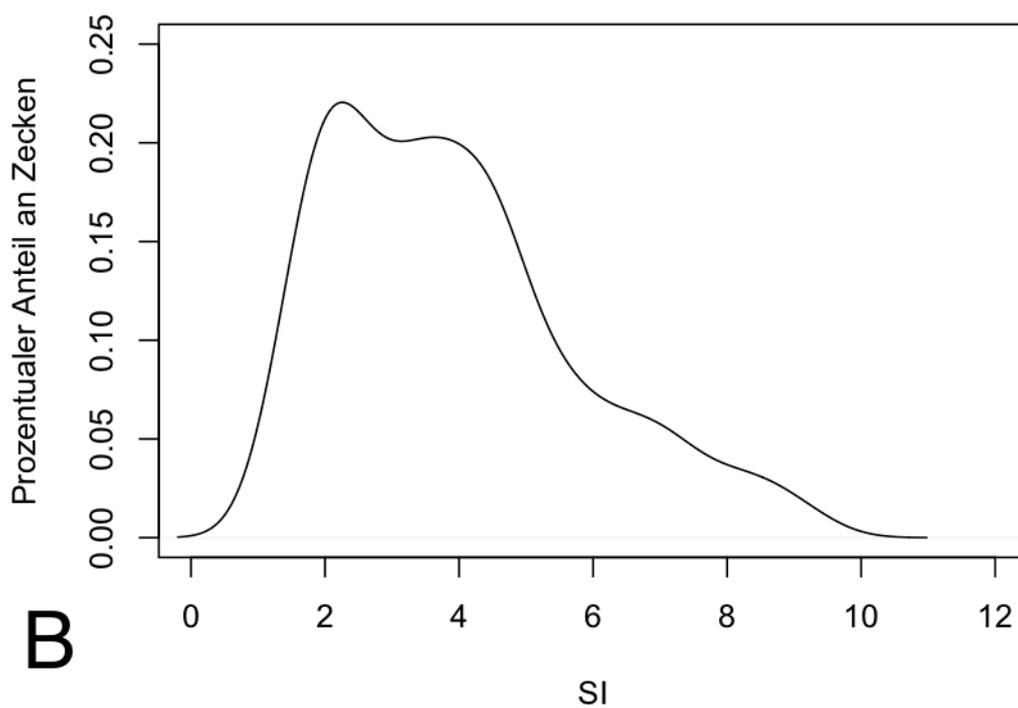
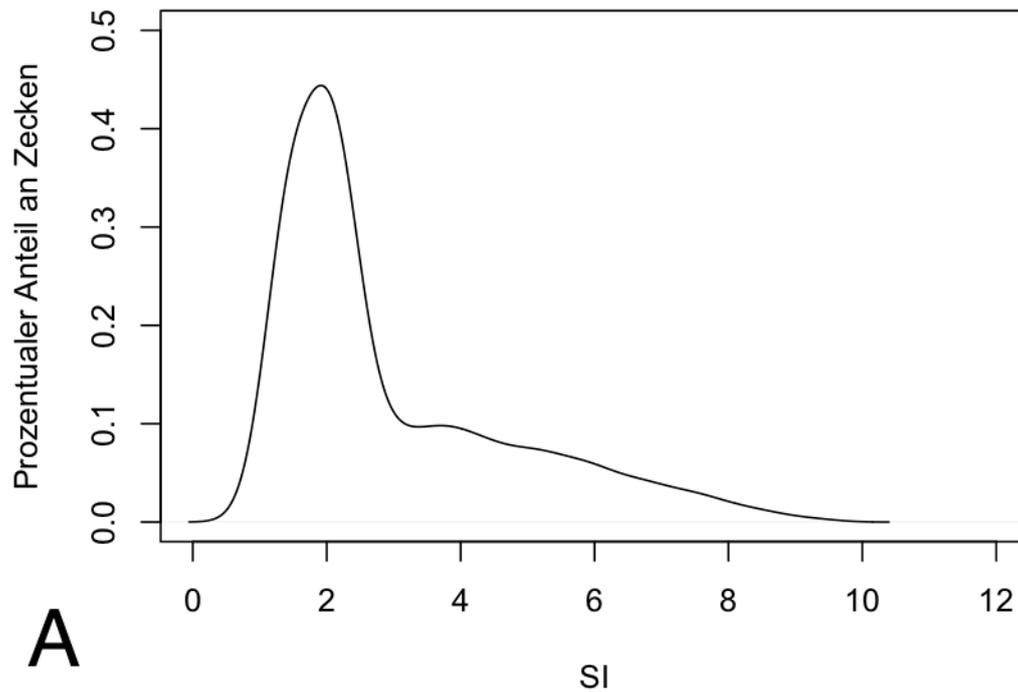


Abb. 15: A) Dichtekurve des SI für weibliche und männliche nicht infizierte Zecken (n=798). Auf der x-Achse ist der SI gegen den prozentualen Anteil der Zecken aufgetragen. B) Dichtekurve des SI für weibliche und männliche infizierte Zecken (n=449). Auf der x-Achse ist der SI gegen den prozentualen Anteil der Zecken aufgetragen.

Tab. 14: PCR-positive weibliche Zecken aufgeteilt in zwei Gruppen mit SI < 2,31 und ≥ 2,31 (entspricht einer Dauer der Blutmahlzeit von 2 Tagen); p-Werte des Mid-P Exakt Test um signifikante Unterschiede zwischen Prävalenzen für beide Gruppen zu verdeutlichen

Zeckenspezies	Erreger	Anteil positiv getesteter Zecken mit einem SI < 2,31	Anteil positiv getesteter Zecken mit einem SI ≥ 2,31	p-Wert
<i>I. ricinus</i>	Anaplasmataceae	2 % (15/635)	9 % (54/635)	<0,0005
	<i>Borrelia</i> spp.	3 % (22/634)	8 % (51/634)	<0,0005
	<i>Rickettsia</i> spp.	8 % (15/196)	54 % (105/196)	<0,0005
	<i>Babesia</i> spp.	0 % (0/191)	2 % (4/191)	<0,05
<i>D. reticulatus</i>	<i>Rickettsia</i> spp.	14 % (33/235)	20 % (47/235)	<0,05

4.3.5 Saisonale Unterschiede

4.3.5.1 Scutal Index

Um die Unterschiede des mittleren SI der verschiedenen Zeckenspezies über die Zeit zu untersuchen, wurde er in Diagrammen gegen die Monate 03/2010-03/2011 aufgetragen (Abb. 16, Abb. 17, Abb. 18). Während der SI von *I. hexagonus* und *I. ricinus* über das Jahr hinweg relativ gleichförmig verläuft, weist der Kurvenverlauf von *D. reticulatus* ein deutliches Maximum im Monat 12/2010 auf. Über die Monate 03/2010 bis 06/2010 ist außerdem ein kontinuierliches Ansteigen des SI von *D. reticulatus* zu beobachten.

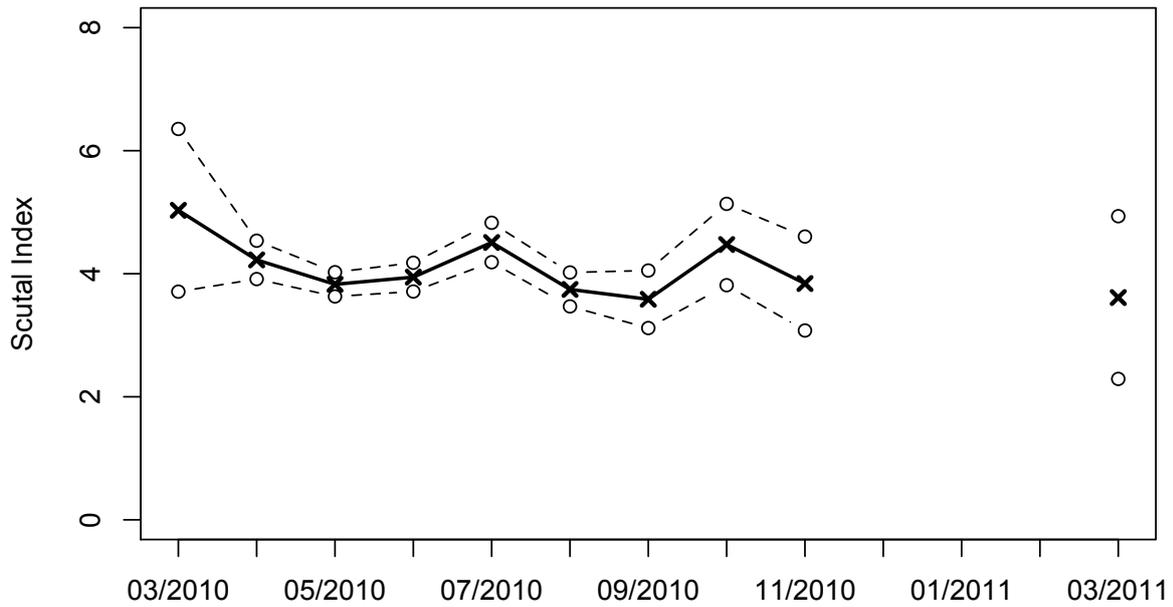


Abb. 16: Mittlerer SI aller *I. hexagonus* (n=146) pro Monat als durchgezogene Linie mit Kreuzen dargestellt. Gestrichelte Linien und Punkte geben die Standardabweichung an.

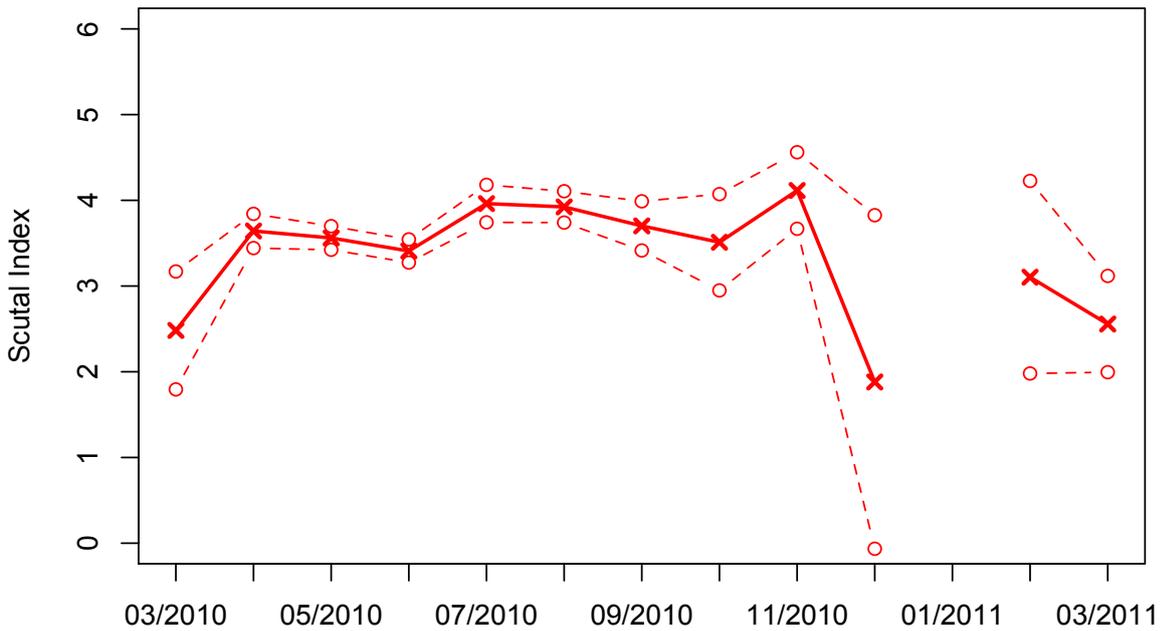


Abb. 17: Mittlerer SI aller *I. ricinus* (n=772) pro Monat als durchgezogene Linie mit Kreuzen dargestellt. Gestrichelte Linien und Punkte geben die Standardabweichung an.

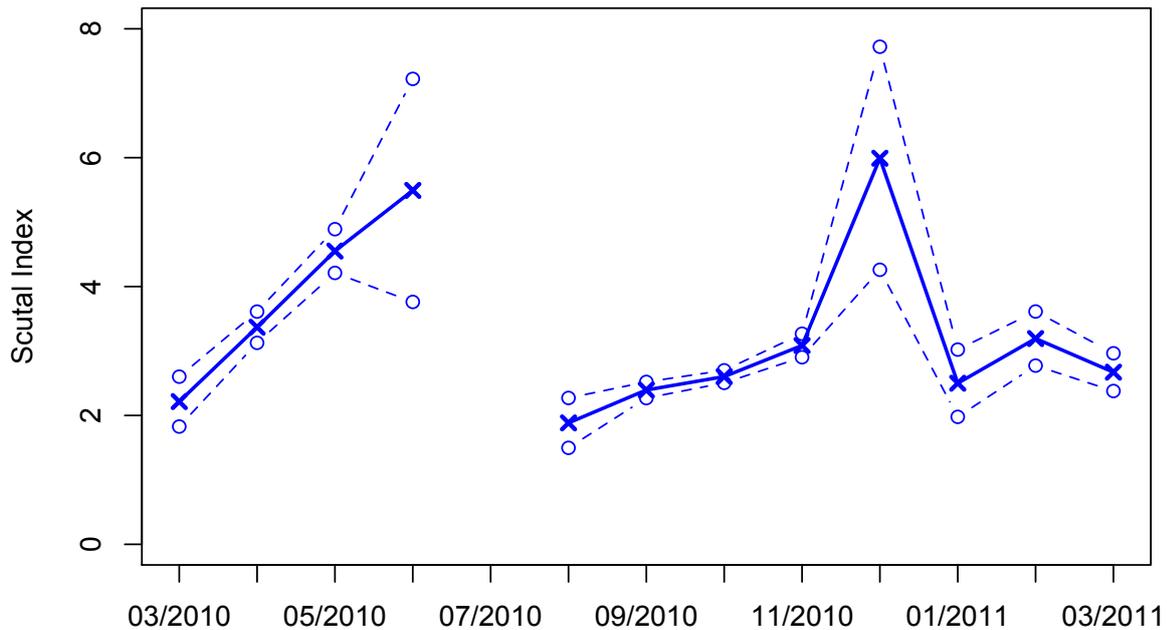


Abb. 18: Mittlerer SI aller *D. reticulatus* (n=776) pro Monat als durchgezogene Linie mit Kreuzen dargestellt. Gestrichelte Linien und Punkte geben die Standardabweichung an.

4.3.5.2 Infektionserreger in *I. ricinus*

Um zu erfahren, ob manche Infektionserreger in bestimmten Monaten gehäuft auftreten, wurden für jede Zeckenart Diagramme für die jeweils enthaltenen Infektionserreger angefertigt. Abb. 19 zeigt den Kurvenverlauf für die Erreger *A. phagocytophilum* (n=50), *Cand. Neoehrlichia mikurensis* (n=33) und *Babesia* spp. (n=5) für die Monate 03/2010-03/2011. Dabei ist einerseits die absolute Zahl der mit den genannten Erregern infizierten Zecken aufgeführt. Daneben ist der jeweilige Anteil der infizierten Zecken an den insgesamt im Monat abgegebenen Zecken dargestellt. Bei der Betrachtung der absoluten Zahlen infizierter Zecken ist ein Kurvenverlauf zu beobachten, der sehr unterschiedlich verläuft und in bestimmten Monaten stark ansteigt. Die Kurven für die Anteile an der Gesamtzahl der im Monat abgegebenen Zecken verlaufen dagegen relativ gleichförmig in einem Bereich von 0-10 %.

Abb. 20 zeigt die gleichen Werte für die Erreger *Rickettsia* spp. (n=125) und *Borrelia* spp. (n=89). *Rickettsia* spp. sind auch in den Anteilswerten in *I. ricinus* in den Monaten 03/2010-05/2010 mit über 20 % vertreten, die restlichen Monate lassen Anteilswerte von 0-10 % erkennen. In der Kurve für *Borrelia* spp. gibt es in den Monaten 04/2010-06/2010 Anteilswerte von über 10 %, die restlichen Monate liegen im Bereich von 0-10 %.

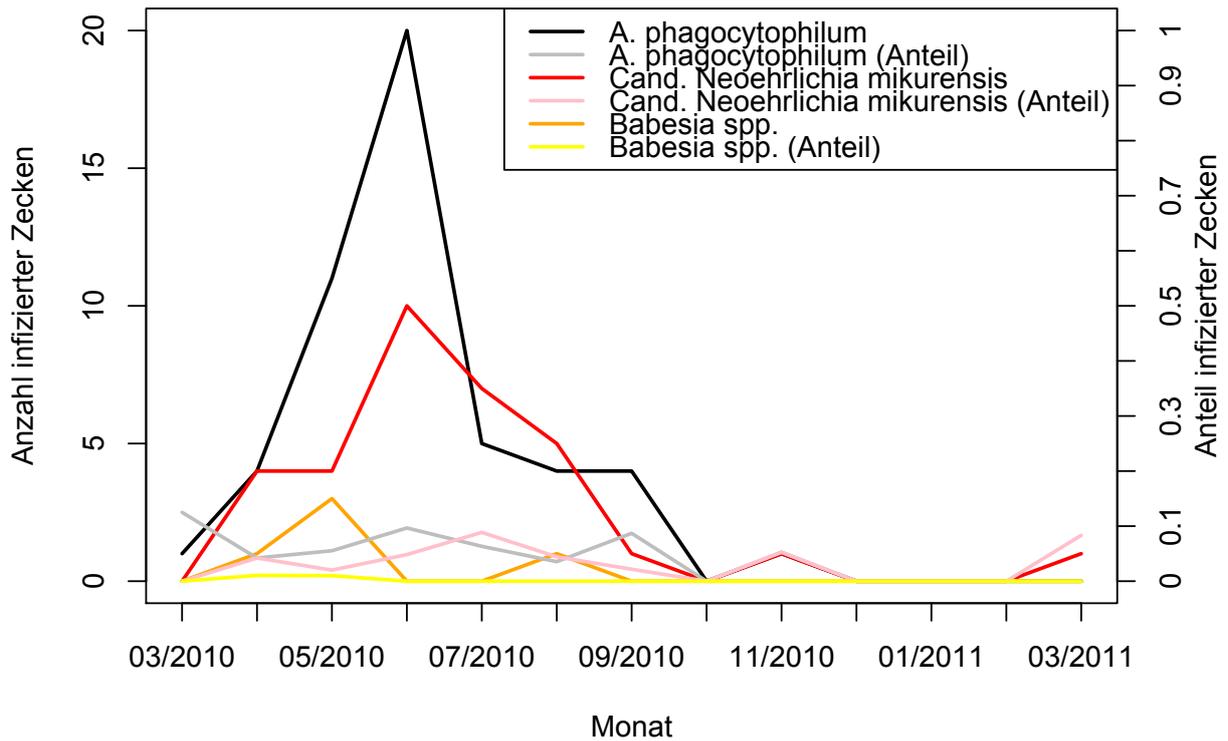


Abb. 19: Anzahl und Anteil von mit *A. phagocytophilum* (n=50), *Cand. Neoehrlichia mikurensis* (n=33) oder *Babesia* spp. (n=5) infizierten *I. ricinus* für die Monate 03/2010-03/2011.

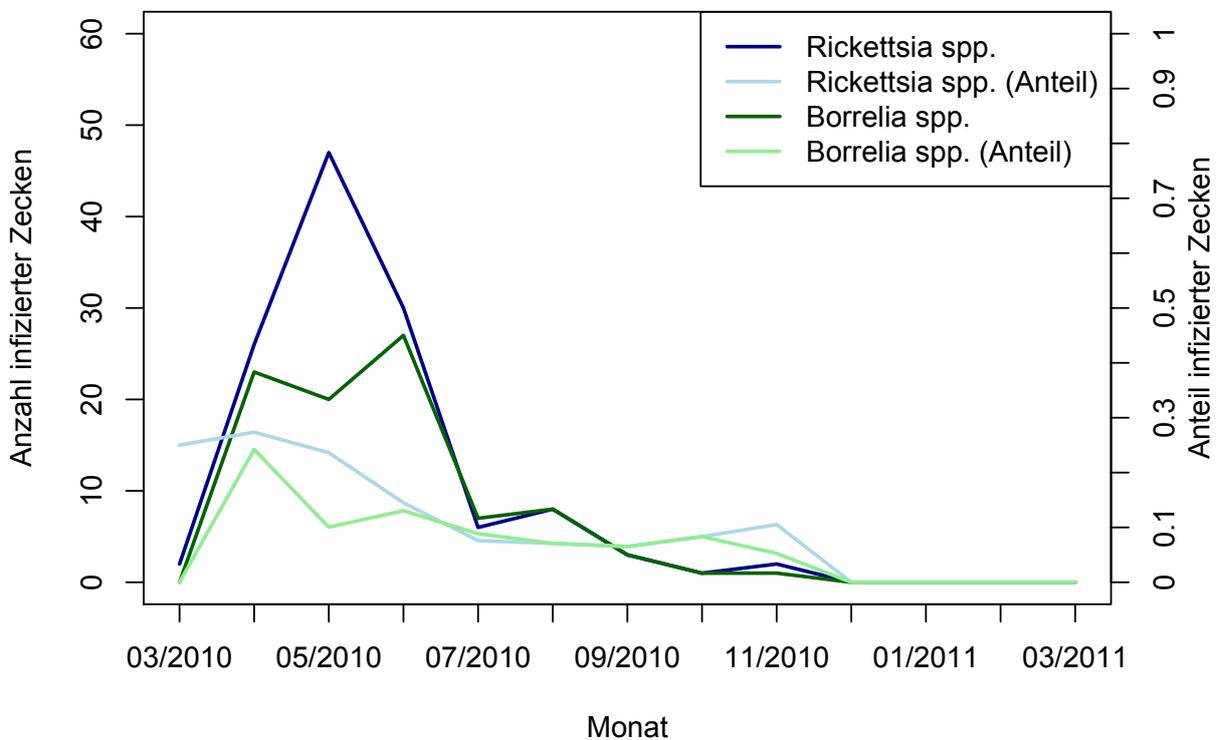


Abb. 20: Anzahl und Anteil von mit *Rickettsia* spp. (n=125) oder *Borrelia* spp. (n=89) infizierten *I. ricinus* für die Monate 03/2010-03/2011.

4.3.5.3 Infektionserreger in *I. hexagonus*

Für *I. hexagonus* sind in Abb. 21 die absoluten Zahlen an infizierten Zecken sowie die Anteilswerte an insgesamt im Monat abgegebenen Zecken dieser Spezies abgebildet. Für Anaplasmataceae (n=15) und *Babesia* spp. (n=3) verlaufen die Anteilswerte über das Jahr verteilt relativ gleichförmig zwischen 0-10 %. *Cand. Neoehrlichia mikurensis* weist in der Kurve für Anteilswerte ein Maximum in den Monaten 10/2010-11/2010 auf. Dies ist vor allem bedingt durch die niedrige Anzahl der insgesamt in diesen Monaten abgegebenen *I. hexagonus*. Diese betrug in den Monaten Oktober 2010 bzw. November 2010 4 Zecken bzw. 3 Zecken. Jede positiv getestete Zecke erhöht dadurch den Anteilswert deutlicher als in Monaten, in denen viele Zecken abgegeben wurden, so dass es sich wahrscheinlich um eine zufällige Häufung handelt.

In Abb. 22 sind Anteil und Anzahl von mit *Rickettsia* spp. (n=67) oder *Borrelia* spp. (n=17) infizierten *I. hexagonus* dargestellt. Für *Rickettsia* spp. sind relativ hohe Anteilswerte abgebildet. Im Monat 03/2011 lässt sich dies dadurch erklären, dass die einzige abgegebene *I. hexagonus* positiv auf *Rickettsia* spp. getestet wurde. Insgesamt beträgt die höchste Anzahl der gesammelten und auf *Rickettsia* spp. getesteten Zecken maximal 45 (Monat 05/2010). Es wird damit eine relativ geringe Anzahl an Zecken betrachtet, womit positiv getestete Zecken schwerer ins Gewicht fallen. Bezüglich *Borrelia* spp. verläuft die Kurve ebenfalls nicht gleichförmig, es zeigen sich Maxima in den Monaten 05/2010 und 08/2010. Auch diese ergeben sich durch die relativ geringe Gesamtzahl der monatlich von dieser Spezies abgegebenen Zecken.

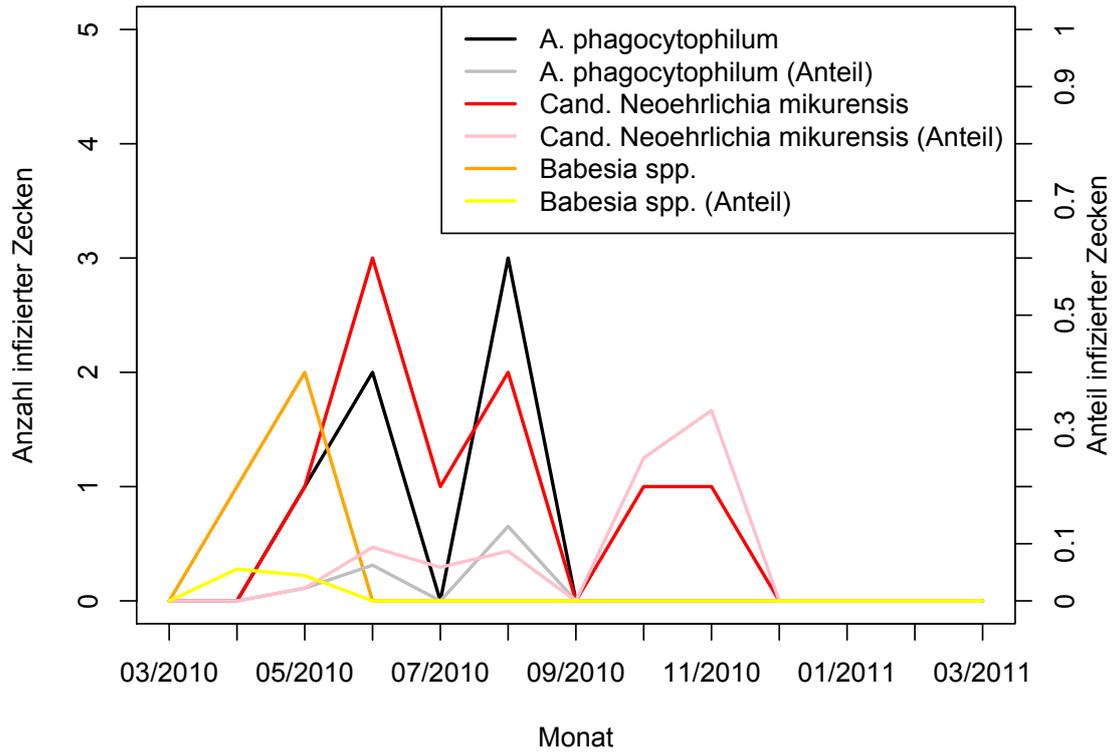


Abb. 21: Anzahl und Anteil von mit *A. phagocytophilum* (n=6), *Cand. Neoehrlichia mikurensis* (n=9) oder *Babesia* spp. (n=3) infizierten *I. hexagonus* für die Monate 03/2010-03/2011.

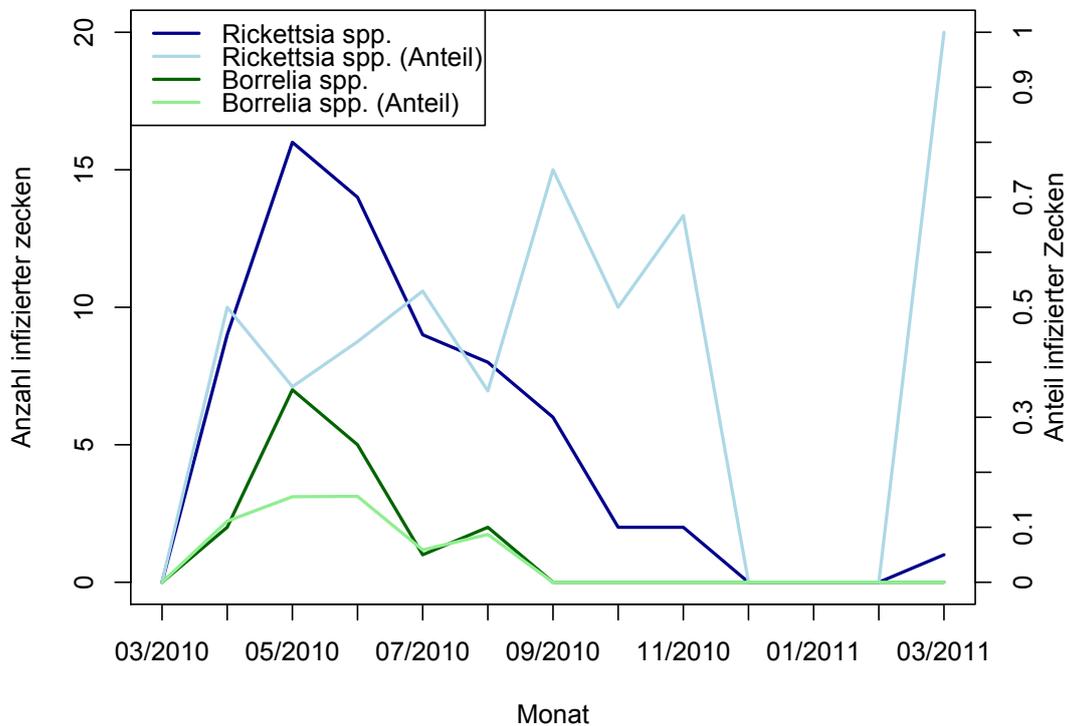


Abb. 22: Anzahl und Anteil von mit *Rickettsia* spp. (n=67) oder *Borrelia* spp. (n=17) infizierten *I. hexagonus* für die Monate 03/2010-03/2011.

4.3.5.4 Infektionserreger in *D. reticulatus*

In Abb. 23 sind Anzahl und Anteil an mit *Rickettsia* spp. (n=107) infizierten *D. reticulatus* nach Monaten abgebildet. Ein Maximum zeigt sich im Anteil der mit *Rickettsia* spp. infizierten Zecken für den Monat 06/2010. Dieses lässt sich dadurch erklären, dass die einzige hier abgegebene Zecke positiv getestet wurde und somit 100 % der in diesem Monat abgegebenen Zecken positiv getestet wurden.

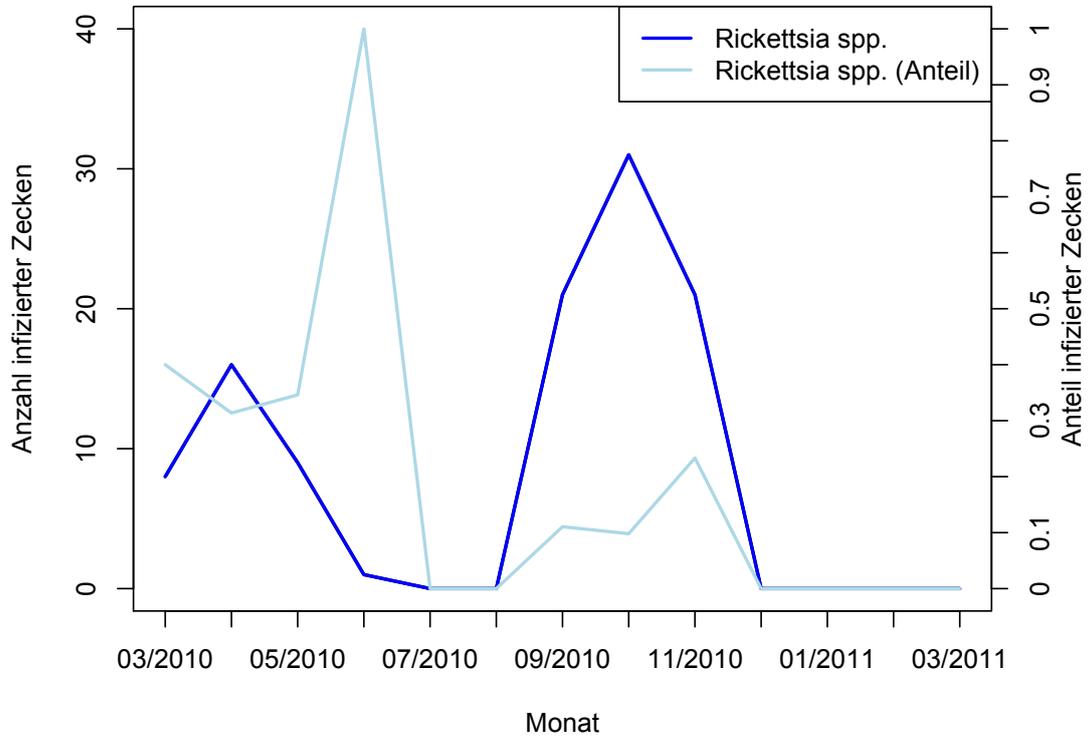


Abb. 23: Anzahl und Anteil von mit *Rickettsia* spp. (n=107) infizierten *D. reticulatus* für die Monate 03/2010-03/2011.

4.3.5.5 Zeckenbefall

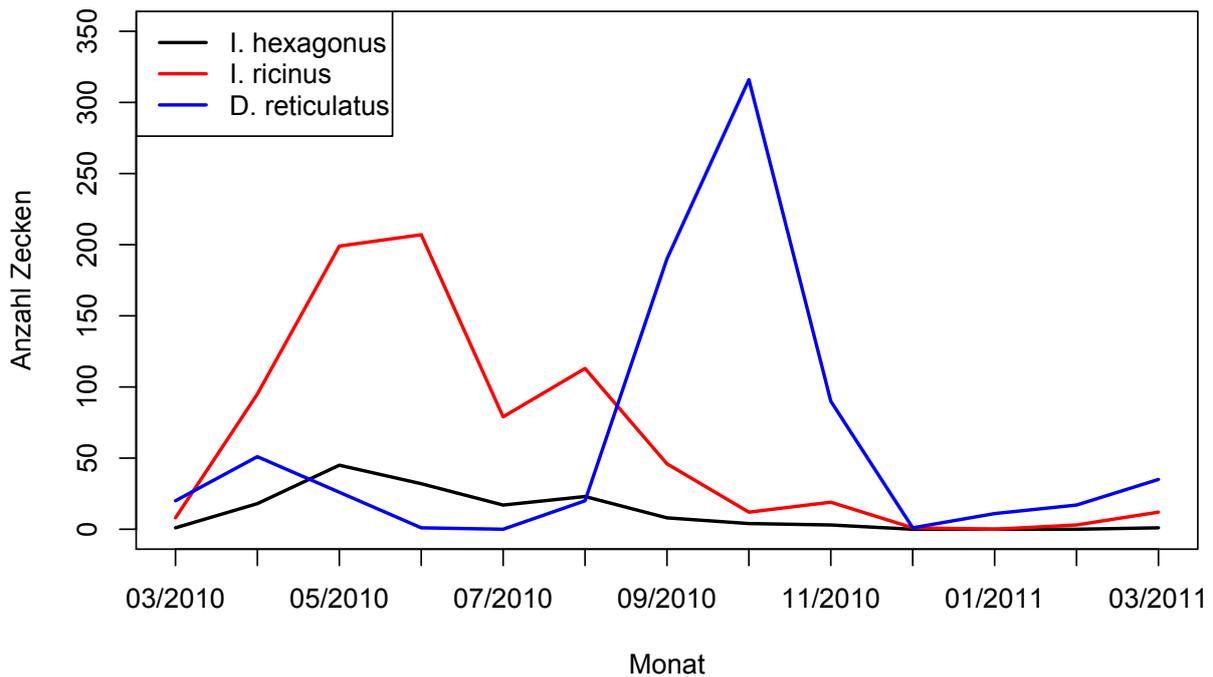


Abb. 24: Darstellung der Anzahl von abgegebenen Zecken pro Monat, nach Zeckenspezies aufgetrennt (Beck, 2012).

Der Verlauf der jahreszeitlichen Aktivität, wie in Abb. 24 (Beck, 2012) zu erkennen, ist für *I. ricinus* und *D. reticulatus* biphasisch, es lässt sich eine Unterscheidung in Frühjahrs- und Herbstmonate machen. Der Verlauf der Kurve für *I. hexagonus* verläuft sehr flach bis auf das einzelne Maximum im Monat Mai 2010.

Um zu erfassen, ob bestimmte Erreger im Frühjahr oder im Herbst in signifikant unterschiedlichem Maße auftreten, wurden die Anzahlen (Tab. 15) der positiv getesteten Zecken für die erste Jahreshälfte (03/2010-07/2010) mit denen der zweiten Jahreshälfte (08/2010-12/2010) mittels Chi-Quadrat-Test und Fisher-Exact Test verglichen. Dabei wurden Signifikanzen für *I. ricinus* und *I. hexagonus* bezüglich der Erreger *A. phagocytophilum*, *Cand. Neoehrlichia mikurensis*, *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp. untersucht. Für *D. reticulatus* wurden Unterschiede im Vorkommen von *Rickettsia* spp. in der ersten und zweiten Jahreshälfte getestet. Die Unterschiede von Prävalenzen der ersten und zweiten Jahreshälfte waren meist nicht signifikant ($p > 0,05$). Lediglich für *Borrelia* spp. in *I. ricinus* wurde mittels Chi-Quadrat-Test und Fisher-Exakt Test ein signifikant vermehrtes Vorkommen von Erregern in der ersten Jahreshälfte festgestellt ($p < 0,05$).

Tab. 15: Anzahl der mit Infektionserregern infizierten Zecken in der ersten Jahreshälfte (03/2010-07/2010) und in der zweiten Jahreshälfte (08/2010-12/2010)

Zecken- spezies	Erreger	03/2010-07/2010			08/2010-12/2010		
		Positiv getestete Zecken		Summe der unter- suchten Zecken	Positiv getestete Zecken		Summe der unter- suchten Zecken
		absolut	%		absolut	%	
<i>I. ricinus</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	41	7,2	568	9	4,7	191
	<i>Cand. Neoehrlichia mikurensis</i>	25	4,4	568	7	3,7	191
	<i>Rickettsia</i> spp.	111	61,7	180	14	58,3	24
	<i>Borrelia</i> spp.	76	13,5	563	13	6,8	191
	<i>Babesia</i> spp.	4	2,3	173	1	3,8	26
<i>I. hexagonus</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	3	2,7	113	3	7,9	38
	<i>Cand. Neoehrlichia mikurensis</i>	5	4,4	113	4	10,5	38
	<i>Rickettsia</i> spp.	48	42,9	112	18	47,4	38
	<i>Borrelia</i> spp.	15	13,3	113	2	5,3	38
	<i>Babesia</i> spp.	3	4,0	75	0	0,0	24
<i>D. reticulatus</i>	<i>Rickettsia</i> spp.	34	47,2	72	73	38,6	189

5 Diskussion

Zecken sind obligat blutsaugende Arthropoden, die als Vektoren verschiedener Infektionserreger während der Blutmahlzeit ihre Wirte infizieren können. Bei der Übertragung von Erregern durch Zecken spielt die Dauer der Blutmahlzeit eine entscheidende Rolle, weil viele Erreger erst nach einer bestimmten Zeit der Anheftung der Zecke am Wirt übertragen werden. Für eine Reihe von zeckenübertragenen Infektionserregern sind die Übertragungszeiten bekannt. Je nach Region sind unterschiedliche Zecken und Infektionserreger endemisch. Der laufende Wandel von Erregerprävalenzen (Beugnet und Marie, 2009), die geographische Veränderung von Zeckenhabitaten (Medlock et al., 2013) sowie der stete Nachweis neuer Erreger (Jahfari et al., 2012) belegen die Dynamik im Komplex der zeckenübertragenen Erkrankungen. Diese erfordert die kontinuierliche Durchführung von Studien an Zecken und ihren Wirten, um das Gefährdungspotential von Tieren und Menschen einschätzen zu können.

Um zu einer Einschätzung des allgemeinen Gefährdungspotentials Berliner Hunde zu gelangen, ist das Ziel dieser Arbeit, Erregerprävalenzen in Berliner Zecken zu ermitteln. Weiterhin soll über den Zusammenhang des SI der Zecken mit der Dauer der Blutmahlzeit eine Einschätzung zur Wahrscheinlichkeit einer Erregerübertragung auf die an der Studie teilnehmenden Hunde gegeben werden.

5.1 Scutal Index

Der SI liefert eine grobe Einschätzung für die Dauer der Blutmahlzeit von Zecken. Ab einer Dauer der Blutmahlzeit von 24 Stunden unterscheiden sich SIs für gesogene Zecken signifikant voneinander, wenn der Abstand zwischen den Messungen 24 h beträgt (Dautel et al., 2006). Für Erreger mit nur kurzer Übertragungszeit, wie beispielsweise *Borrelia* spp. in *I. ricinus* mit einer Übertragungszeit von unter 16,7 Stunden (Kahl et al., 1998), ist der SI deshalb in den ersten 24 Stunden nicht von Nutzen. Für eine Einschätzung der Wahrscheinlichkeit einer Erregerübertragung von *Borrelia* spp. bei Zecken mit niedrigem SI wären andere Indizes wie beispielsweise ein Coxalindex mit früher messbaren signifikanten Unterschieden zu verwenden. Dieser detektiert Veränderungen der Dimensionen des Zeckenkörpers, die früh im Verlauf der Blutmahlzeit vor sich gehen, durch Messung der Distanz zwischen den basalen Coxae des vierten Beinpaars (Gray et al., 2005). Für die weiteren untersuchten Erreger kann aufgrund der etwas längeren Übertragungszeiten von 24-72 Stunden eine Einschätzung einer Übertragungswahrscheinlichkeit mittels SI getroffen werden.

Über 40 % der weiblichen *D. reticulatus* und über 60 % der weiblichen *I. ricinus* wurden laut SI-Ergebnissen erst nach über 2 Tage andauernder Blutmahlzeit gefunden und entfernt. Der Median des SI für weibliche Zecken lag für *D. reticulatus* bei 2 Tagen, für *I. ricinus* sogar bei 3 Tagen. In der Vorgängerstudie gaben mehr als 60 % der Hundebesitzer an, ihre Tiere mindestens einmal täglich auf Zecken abzusuchen (Beck, 2012). Demzufolge werden viele Zecken in den ersten Tagen ihrer Blutmahlzeit übersehen. Ab einer Blutmahlzeit von zwei Tagen können alle in der Studie untersuchten Erreger mit hoher Wahrscheinlichkeit übertragen werden (Kahl et al., 1998; des Vignes et al., 2001; Heile et al., 2007). Im Zuge der Vorgängerstudie wurde der Zeckenprophylaxestatus der Hunde erfragt und die Anwendung der laut Arzneimittelgesetz dafür zugelassenen Mittel bewertet. Etwa 2/3 der Zecken stammten von Hunden, die bezüglich der Zeckenprophylaxe fehlerhaft oder gar nicht behandelt wurden. Lediglich das verbleibende Drittel der Zecken stammte von Hunden, die korrekt behandelt wurden (Beck, 2012). Dies trägt dazu bei, den im Durchschnitt hohen SI und das damit lange Verbleiben der Zecken am Hund zu erklären.

Bezugnehmend auf das Geschlecht der Zecken ließ sich im Vergleich des SI weiblicher Zecken zu dem männlicher Zecken der gleichen Art ein signifikanter Unterschied darstellen. Nur weibliche Zecken nehmen so viel Blut auf, dass sich ihr Körper auf ein Mehrfaches der ursprünglichen Größe ausdehnt (Sonenshine, 1991). Die Messung des SI ist daher nur für weibliche Zecken sinnvoll, da die SIs der männlichen Zecken die SIs von nüchternen weiblichen Zecken nicht übersteigen (Dautel et al., 2006). Die Tatsache, dass weibliche Zecken mehr Blut aufnehmen, kann auch vermuten lassen, dass weibliche Zecken eine signifikant höhere Infektionsrate aufweisen als männliche. Sie haben über eine längere Zeit Kontakt mit dem Blut des Wirts und die Wahrscheinlichkeit einer Infektion durch Erreger steigt dadurch. Diese These lässt sich durch die zum SI aufgeführten Dichtekurven (Abb. 15) stützen. Aus ihnen lässt sich ablesen, dass infizierte Zecken einen signifikant höheren SI aufwiesen als nicht infizierte (Kapitel 4.3.4) und somit eine längere Zeit am Wirt verbracht haben. Auch der Mittelwert des SI infizierter Zecken (3,9) lag signifikant über dem für nicht infizierte Zecken (3,0). Zudem stützte die Untersuchung von Infektionshäufigkeiten für Zecken mit unterschiedlich hohem SI (Kapitel 4.3.4) diese These, wie in Kapitel 5.3 erörtert wird.

Unterschiede des SI in Bezug auf die Felllänge der befallenen Hunde ließen sich nur für *D. reticulatus* feststellen. Hunde mit langem Fell waren mit *D. reticulatus* befallen, die einen signifikant höheren SI aufwiesen, als Hunde mit mittellangem oder kurzem Fell. Diese Zecken befanden sich also signifikant länger an Hunden mit langem Fell als an Hunden mit mittlerem oder kurzem Fell. Hierbei ist vermutlich ein Zusammenhang mit der Größe der Zecken gegeben. *D. reticulatus* ist mit im nüchternen Zustand 4,2-4,8 mm die größte der in der Studie untersuchten Zeckenarten (Deplazes et al., 2013). Die Wahrscheinlichkeit diese Zecke zu übersehen ist nur bei Hunden mit langem Fell besonders hoch. Andere Zeckenarten wie *I. hexagonus* oder *I. ricinus* werden mit ihrer Größe von 3-4,5 mm (Parola und Raoult, 2001) in nüchternem Zustand auch bei Hunden mit kurzem oder mittlerem Fell leichter übersehen. Da die Angaben der Felllängen auf Aussagen der Hundebesitzer in der Vorgängerstudie beruhen, sind diese nicht unkritisch zu betrachten, es handelt sich um subjektive Einschätzungen (Beck, 2012).

Durch die Betrachtung des SI der gesammelten Zecken aufgetrennt in ihre Fundmonate von 03/2010 bis 03/2011 in einer Grafik für jede einzelne Zeckenspezies (Abb. 16, Abb. 17 und Abb. 18) sollten jahreszeitliche Unterschiede des SI untersucht werden. Dabei ergab sich ein relativ gleichförmiger Kurvenverlauf für *I. hexagonus* und *I. ricinus*. Bei *D. reticulatus* dagegen ließ sich ein Anstieg des SI von gesammelten Zecken im Frühjahr zum Sommer hin beobachten mit einem Maximum im Juni 2010. Ein weiteres Maximum des SI für diese Zeckenspezies konnte im Dezember 2010 beobachtet werden. Mögliche Gründe für einen hohen SI sind vermehrtes Vorkommen von Zecken an Hunden und ein dadurch bedingtes Übersehen mancher Zecken durch die Hundebesitzer. Dies stellt eine Erklärung für das Maximum des SI für *D. reticulatus* im Monat 06/2010 dar. Als weitere Ursache ist zu nennen, dass Hundebesitzer zu bestimmten Jahreszeiten, wie im Winter, nicht damit rechnen, Zecken an ihrem Hund zu finden. Viele der an der Studie teilnehmenden Hundebesitzer gehen davon aus, dass Zecken vor allem während der Sommermonate parasitieren (Beck, 2012). Demzufolge suchen Hundebesitzer ihre Hunde in Wintermonaten vermutlich seltener nach Zecken ab und Zecken haben dadurch die Möglichkeit einer längeren Blutmahlzeit.

Die Ergebnisse für den SI sind neben den genannten Gründen auch deshalb nur Anhaltspunkte und keine beweisenden Ergebnisse, da Zecken aus verschiedenen Gründen ihren Saugakt auch unterbrechen können, um an anderer Stelle weiter zu saugen oder um den Wirt zu wechseln (Nakao und Sato, 1996). Damit ist durch einen hohen SI nicht per se bewiesen, dass die Zecke sich lange auf dem Wirt befand, an dem sie gefunden wurde. Eine weitere Unsicherheit kann die Konservierung der Zecken in Ethanol darstellen. Der Möglichkeit, dass sich der SI durch die Konservierung der Zecken in Alkohol verändern könnte, wurde bereits in einer anderen Veröffentlichung nachgegangen. Der SI von *I. ricinus*

Nymphen wurde dabei vor und nach ihrer Lagerung über 96 Stunden in 70 % Ethanol bestimmt. Die Indizes vor und nach der Lagerung unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Gray et al., 2005). Demzufolge ist davon auszugehen, dass Ethanol die Maße der Zecken und damit den SI nicht beeinflusst. Die in dieser Studie untersuchten Zecken wurden über weit längere Zeiträume von bis zu mehreren Monaten in Ethanol gelagert. Da die fixierende Wirkung von Ethanol aber innerhalb von 3 Tagen vollständig eingetreten ist, sind weitere Änderungen unwahrscheinlich (Mulisch und Welsch, 2010). Außerdem wird Ethanol in zahlreichen mikroskopischen und elektronenmikroskopischen Verfahren als Fixativ eingesetzt, weil es die Morphologie gut konserviert.

Die wenigen eingereichten Nymphen konnten statistisch nicht verwertet werden, da sie einen zu geringen Anteil an der Gesamtanzahl der abgegebenen Zecken ausmachten. Dies lässt darauf schließen, dass Hunde nur selten von Zecken in nymphalen Stadien befallen sind. Wahrscheinlicher ist aber, dass Nymphen aufgrund ihrer geringen Größe leichter übersehen werden. Diese Vermutung wird durch Studien aus der Humanmedizin gestützt, in deren Verlauf sich herausstellte, dass Menschen, die mit adulten Zeckenstadien befallen waren, diese deutlich früher entdeckten als Menschen, die von nymphalen Zeckenstadien befallen waren (Yeh et al., 1995; Falco et al., 1996). Diese Erkenntnis macht deutlich, welche Gefahr von nymphalen Stadien ausgeht. Dadurch, dass sie nicht oder erst sehr spät gefunden werden, ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie eventuell enthaltene Erreger übertragen, sehr hoch. Ein Vergleich der SIs von Nymphen, die von Hunden stammen, mit den SIs der abgegebenen Adulten wäre gewinnbringend, um zu überprüfen, ob Nymphen auch an Hunden später gefunden werden.

5.2 Vor- und Nachteile angewandeter PCR-Diagnostikmethoden

Die PCR hat sich zum diagnostischen Hilfsmittel der Wahl bei vielen Prävalenzstudien entwickelt. Das Vorhandensein von Erreger-DNA in Probenmaterial kann ohne Anzüchtung oder Mikroskopie durch Nachweis der Erreger-DNA untersucht werden. Dabei ist die konventionelle PCR die Standard-Methode und wurde zum Nachweis der Erreger-DNA in den im Zuge dieser Studie untersuchten Proben verwendet. Für den Nachweis von *Rickettsia* spp. und *Borrelia* spp. wurden jeweils zwei verschiedene konventionelle PCRs verwendet. Diese dienten zunächst zum Nachweis der Erregerspezies und im weiteren Verlauf zur Differenzierung von verschiedenen Genospezies.

Für die Ermittlung von Prävalenzen von *Rickettsia* spp. wurde mit einer PCR gearbeitet, die mit einer Nachweisgrenze von 5 Kopien im Plasmid sehr sensitiv Erreger nachweisen konnte. Dabei wurde jedoch nur ein kurzes Stück DNA (203 bp, *gltA*-Gen) amplifiziert, das wenig Basenpaarunterschiede für die Genospeziesdifferenzierung bereithielt. Erst im folgenden Schritt wurde mit der weniger sensitiven PCR gearbeitet, die ein größeres DNA-Fragment desselben Gens (676 bp, *gltA*-Gen) amplifizierte. Damit konnten mehr Basenpaarunterschiede zum Vergleich der einzelnen Genospezies untereinander zur Erregerdifferenzierung dienen. Diese Kombination zweier PCRs bietet den Vorteil, sowohl die Erregerprävalenz genau einschätzen zu können, als auch eine Genospezies für eine Auswahl von Erregern zu bestimmen. Nachteile liegen im hohen Untersuchungsaufwand, da jede positive Probe, die auf enthaltene Genospezies getestet werden sollte, zweimal untersucht wurde.

Der Einsatz einer PCR zum Nachweis des *hbb* Gens (Portnoi et al., 2006) konnte Aufschluss über die Prävalenz von *Borrelia* spp. und die enthaltenen Genospezies bringen. Mit 5 Kopien der Positivkontrolle im Plasmid als Nachweisgrenze ist diese PCR als sehr sensitiv einzustufen. Die Ermittlung der Prävalenz sowie Genospeziesdifferenzierung von Erregern der *B. burgdorferi* Gruppe aber auch von Rückfallfiebererregern werden in einer Reaktion möglich gemacht. Dies stellt den wesentlichen Vorteil der Anwendung dieses Verfahrens dar.

Lediglich die Unterscheidung von *B. bavariensis* und *B. garinii* ist hiermit nicht möglich und ist somit ein Nachteil dieser diagnostischen Methode. Die Anerkennung von *B. bavariensis* als eigenständige Spezies ist jedoch umstritten (van Burgel et al., 2010), es wird die Möglichkeit diskutiert, dass *B. bavariensis* lediglich eine klonale Variante des Erregers *B. garinii* darstellt (Marconi et al., 1999). Dies kann die nicht zu gewährleistende Unterscheidung der beiden Spezies durch die Untersuchung des *hbb* Gens erklären. Die Ergebnisse der das *hbb* Gen nachweisenden PCR ließen zunächst keine 100%ige Zuordnung einiger Proben zu *B. miyamotoi* zu, da die Sequenz dazu noch nicht veröffentlicht wurde. Für den Nachweis dieser Genospezies musste bisher mit einer nested PCR gearbeitet werden, die das 16S rDNA Gen nachwies (Richter et al., 2003). Die nested PCR ist ein Verfahren, welches zwei PCR-Durchläufe nötig macht und dadurch anfällig für Kreuzkontaminationen ist. Durch die Veröffentlichung der Sequenz des *hbb* Gens für *B. miyamotoi* ist für die Zukunft eine sehr sensitive Zuordnung von *Borrelia* Genospezies mit geringem Aufwand sowie einer geringen Gefahr der Kontaminationen gesichert.

Für den Nachweis von *Babesia* spp. wurde eine einzige konventionelle PCR verwendet. Diese detektierte das 18S rDNA-Gen mit einer Fragment-Größe von 602-639 bp, wobei ein bereits veröffentlichtes Primerpaar (Matjila et al., 2004) leicht modifiziert wurde um den Nachweis von *Hepatozoon* spp. zu unterbinden. Mit einer Nachweisgrenze von 10 Kopien eines Plasmids von *B. gibsoni* gilt diese PCR als sehr sensitiv. Positiv detektierte Proben konnten durch das Ausschneiden der Banden aus dem Agarosegel direkt im Anschluss an die PCR aufgereinigt und zur Sequenzierung verschickt werden. Damit konnte mittels einer einzigen PCR der Nachweis und die Speziesdifferenzierung der Erreger der Ordnung Piroplasmida gelingen.

Zusätzlich zur Durchführung einer konventionellen PCR wurde für den Nachweis von Anaplasmataceae die HRM genutzt. Diese PCR, gefolgt von einer Schmelzkurvenanalyse, weist mit 100 Kopien Positivkontrolle im Plasmid eine schlechtere Sensitivität auf als die verwendete konventionelle PCR mit 20 Kopien. Jedoch bietet sie im Vergleich zu anderen Nachweismethoden für Anaplasmataceae viele Vorteile. Im Anschluss an die konventionelle PCR musste zur Genospeziesdifferenzierung eine Aufreinigung der PCR-Produkte gefolgt von der Sequenzierung in einem externen Labor erfolgen. Die Durchführung der HRM bietet die Möglichkeit der Genospeziesdifferenzierung in nur einer Reaktion, die mit einem gängigen Gerät (C 1000TM Thermal Cycler Biorad mit CFX 96TM Real-Time System) sowie entsprechender Software (Precision Melt AnalysisTM) schnell durchführbar ist. Es entstehen keine zusätzlichen Arbeitsschritte durch eine Aufreinigung, zudem ergibt sich kein Zeitverlust durch Versenden von Proben in externe Labore zur Sequenzierung. In bereits veröffentlichten Studien zur Differenzierung von *A. phagocytophilum* und *Cand. Neoehrlichia mikurensis* wurde mit mehreren Sonden und Primerpaaren gearbeitet (Jahfari et al., 2012), auch nested PCRs wurden zur Detektion der Erreger eingesetzt (Massung et al., 1998; Rar et al., 2010). Dagegen kann mittels der hier etablierten Methode ein einzelnes Primerpaar ohne die zusätzliche Verwendung von Sonden eine deutliche Differenzierung der beiden in Europa endemischen Mitglieder der Familie der Anaplasmataceae bewirken. Zusätzlich wurde der Nachweis einer durch beide Erreger koinfizierten Probe erbracht, die dabei generierte Schmelzkurve unterschied sich deutlich von den Kurven der Einzelerregerinfektionen.

5.3 Infektionsraten

Die in dieser Studie ermittelten Erregerprävalenzen geben einen Überblick über den Infektionsstatus von Zecken, die an Berliner Hunden parasitieren. Im Gegensatz zu Studien, in denen Zecken aus der Natur geflaggt werden, liefern die hier gewonnenen Ergebnisse ein Bild der tatsächlichen Belastung von Hunden durch mit Pathogenen infizierten Zecken. Mit Gesamtfektionsraten von 65 % für *I. ricinus* (n=140), 59 % für *I. hexagonus* (n=100) und 64

% für *D. reticulatus* (n=140) der auf alle Erreger untersuchten Zecken im Zusammenhang mit den im Durchschnitt hohen gemessenen SIs zeigt sich eine nicht von der Hand zu weisende Infektionsgefahr für die an der Studie teilnehmenden Hunde. Der Anteil an mit Anaplasmataceae infizierten weiblichen *I. ricinus* mit einem SI-Wert, der einer Blutmahlzeit von mindestens 2 Tagen entsprach, betrug 9 %. Für *Borrelia* spp. lag der Anteil weiblicher *I. ricinus* mit entsprechend hohem SI bei 8 %, für *Rickettsia* spp. bei 54 % und für *Babesia* spp. bei 2 %. Weibliche *D. reticulatus* mit einem SI von mindestens 2,31 und einer Infektion mit *Rickettsia* spp. kamen zu 20 % vor. Für diese Zecken bestand eine hohe Wahrscheinlichkeit einer Erregerübertragung auf die Hunde. Weiterhin wiesen sie bezüglich aller getesteten Erregergruppen signifikant höhere Prävalenzen auf als Zecken mit einem SI unter 2,31. Dies lässt einerseits darauf schließen, dass für Zecken, die über längere Zeit Blut aufnehmen, eine höhere Wahrscheinlichkeit besteht sich mit Erreger-DNA zu infizieren als für Zecken, die über eine kurze Zeit Blut aufnehmen. Eine weitere Erklärung liegt in der Aktivierung und Vermehrung von bereits vorhandenen Erregern in den Zecken während und nach der Blutmahlzeit, um die Effektivität einer Übertragung der Erreger auf den nächsten Wirt zu steigern. Es ist möglich, dass Erreger über eine Zeitspanne von mehreren Monaten in inaktivem Zustand in der Zecke verbleiben und erst durch eine Blutmahlzeit eine Aktivierung der Erreger stattfindet und diese sich vermehren (Hodzic et al., 1998; Katavolos et al., 1998).

Weibliche Zecken, die auf alle Erreger untersucht wurden, wiesen eine Infektionsrate von 61 % (n=282) auf. Die Infektionsrate für männliche Zecken konnte aufgrund der geringen Anzahl der auf alle Erreger untersuchten Proben (n=36) nicht festgestellt werden, somit ist kein Vergleich zwischen den Infektionsraten der Zeckengeschlechter möglich. Jedoch ist aufgrund der weit höheren SIs von weiblichen Zecken und dem in Kapitel 4.3.4 hergestellten positiven Zusammenhang zwischen SI und der Wahrscheinlichkeit einer Infektion davon auszugehen, dass weibliche Zecken eine höhere Infektionsrate aufweisen. Es gibt bislang wenige Studien, die statistische Zusammenhänge zwischen der Infektionsrate und dem Zeckengeschlecht hergestellt haben, diese behandeln vornehmlich *B. burgdorferi* s.l.. Mehrere Studien belegen eine höhere Infektionsrate von *B. burgdorferi* s.l. in weiblichen Zecken im Vergleich zu männlichen (Stanczak et al., 2002; Christova et al., 2003; Wodecka, 2003; Sytykiewicz et al., 2012). In einer europäischen Metaanalyse von 110 Veröffentlichungen, die das Vorkommen von *B. burgdorferi* s.l. in *I. ricinus* untersuchten, konnte jedoch kein Unterschied der Infektionshäufigkeit zwischen weiblichen und männlichen *I. ricinus* ausgemacht werden (Rauter und Hartung, 2005). Laut Halos et al. (2010) gibt es drei Hypothesen, die erklären können, warum weibliche Zecken eine höhere Infektionsrate aufweisen als männliche. Zunächst besteht durch die Tatsache, dass weibliche Zecken mehr Blut aufnehmen als männliche eine höhere Wahrscheinlichkeit einer Aufnahme von Erregern (Dusbabek, 1996). Weiterhin nehmen männliche Zecken teilweise keine Blutmahlzeit zu sich, dadurch werden in ihnen enthaltene Erreger nicht weitergetragen. Prozesse wie die erhöhte Mortalität von Bakterien in männlichen Zecken oder die erhöhte Mortalität von männlichen Zecken, die die Infektionsrate von männlichen Zecken herabsenken, würden daher keine Gegenselektion erfahren werden, da sie die bakterielle Fitness nicht herabsenken (Halos et al., 2010). Als letzte Hypothese wird vorgeschlagen, dass immature männliche Zecken Blut von Wirten aufnehmen, die eine niedrigere Reservoirkompetenz aufweisen als Wirte weiblicher Zecken (De Meeus et al., 2004).

Für zukünftige Studien wäre es interessant mehr Nymphen in die Untersuchung mit einzubeziehen. Ihre Infektionsraten für nicht transovariell übertragbare Erreger wie *A. phagocytophilum* und *B. burgdorferi* s.l. sind geringer als die von adulten Zecken (Rauter und Hartung, 2005; Grzeszczuk und Stanczak, 2006; Silaghi et al., 2008; Schorn et al., 2011; Richter et al., 2012), doch auch bezüglich *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp. ergeben sich mehr Möglichkeiten für eine Zecke sich zu infizieren, je älter sie ist (Hildebrandt et al., 2010; Oines et al., 2012). Trotz geringerer Infektionsraten können Nymphen also ein großes Risiko darstellen. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf die nachgewiesene spätere Entdeckung von Nymphen am Wirt (Yeh et al., 1995).

Die nicht durchgeführten Untersuchungen von *D. reticulatus* auf Anaplasmataceae und *Borrelia* spp. wurden dadurch begründet, dass sich gemäß Erfahrungen der Arbeitsgruppe sehr niedrige Prävalenzen von *Borrelia* spp. und Anaplasmataceae in dieser Zeckenspezies nachweisen lassen. Diese Einschätzung wird durch Literatur gestützt, die eine Abwesenheit dieser Erreger in *D. reticulatus* aus Berlin belegt (Richter et al., 2013). Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion von *I. hexagonus* war signifikant höher als die einer Infektion von *D. reticulatus* ($p < 1,8 \times 10^{-11}$, Odds Ratio 0,13) und *I. ricinus* ($p < 0,002$, Odds Ratio 0,39). Eine mögliche Erklärung ist, dass *I. hexagonus* Männchen und Weibchen aufgrund ihrer Lebensweise in der Behausung ihres Wirtes sich räumlich nah beieinander aufhalten und zur gleichen Zeit an denselben Wirten parasitieren. Somit kann sich, trotz unterschiedlichen Saugverhaltens, eine homogene Verteilung der Infektionsraten zwischen den Geschlechtern ergeben. Die These, dass *I. hexagonus* signifikant höhere Infektionsraten aufwies als *D. reticulatus* und *I. ricinus*, wurde auch durch die Berechnung im gemischten Modell bestätigt.

Die Berechnung von Zusammenhängen zwischen der Infektion einer Zecke mit Felllänge, Geschlecht, Rasse und Größe des Hundes sowie Zeckengeschlecht und –spezies ergab bezüglich der hundebezogenen Faktoren keine signifikanten Zusammenhänge. Die Größenangaben der Hunde beruhten nicht auf tatsächlichen Messungen. Die Angaben wurden nachträglich mittels Rasseschlüssel eingetragen und waren daher nur für laut Besitzerangaben reinrassige Hunde ($n=283$, 64 %) angegeben. Demzufolge sind die Ergebnisse der Berechnungen, die die Felllänge und die Größe der Hunde mit einbezogen, kritisch zu betrachten. Es gibt nur wenig Studien zum natürlichen Zeckenbefall bei Hunden, in diesen wird zwar auf den Zeckenbefall begünstigende Faktoren eingegangen, jedoch nicht der Infektionsstatus von Zecken untersucht. In einer Studie an 2.275.048 Hunden aus 40 verschiedenen US-Bundesstaaten wurde der natürliche Zeckenbefall der Hunde untersucht (Raghavan et al., 2007). Hunde männlichen Geschlechts und junge Hunde waren signifikant häufiger mit Zecken befallen als weibliche Hunde und ältere Hunde, außerdem waren Toy-Rassen signifikant weniger Zeckenbefall ausgesetzt als alle anderen untersuchten Rassen. Das Gewicht der Hunde konnte in keine Verbindung mit dem Zeckenbefall gesetzt werden. Die Infektionsraten der Zecken der Studie wurden nicht untersucht, es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass Hunde mit vermehrtem Zeckenbefall auch einer erhöhten Infektionsgefahr ausgesetzt sind (Raghavan et al., 2007). In einer weiteren Studie wurde nachgewiesen, dass Hunde mit mittellangem Fell einer im Vergleich zu Hunden mit kurzem Fell signifikant höheren Zeckeninfestationsrate ausgesetzt sind, es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zu Hunden mit langem Fell (Smith et al., 2011).

Die Möglichkeit einer Infektion von Zecken durch das Blut der Hunde sollte geprüft werden, indem die Hunde, von denen die meisten infizierten Zecken stammten, einzeln betrachtet wurden. Dabei war das Auswahlkriterium eine Anzahl von über 13 abgegebenen infizierten Zecken pro Hund, nicht etwa ein hoher Anteil infizierter Zecken pro Hund. Die Betrachtung des Anteils an infizierten Zecken je Hund scheint hier zunächst sinnvoller. Da diese Betrachtungsweise jedoch nur bei ausreichender Anzahl an insgesamt abgegebenen Zecken aussagekräftige Ergebnisse liefert, wurde mit oben beschriebener Methode gearbeitet. Von 172 (39%) der 441 Hunde stammten 2 oder mehr Zecken mit einem SI von über 2,31. Vier Hunden wurde eine Anzahl von mindestens 13 Zecken zugeordnet. Es stellte sich heraus, dass für alle vier betrachteten Hunde eine hohe Wahrscheinlichkeit bestand, dass sie pathogene Erreger in ihrem Blut beherbergten, da eine hohe Erregerprävalenz in den abgegebenen Zecken nachgewiesen wurde (Kapitel 4.3.3). Vom ersten und dritten Hund stammten Zecken mit im Vergleich zur Gesamtprävalenz der Studie zwei- bis vierfach erhöhten Prävalenzen für *Borrelia* spp.. Dies ist ein Indiz für eine Infektion dieser Hunde mit *Borrelia* spp. Vom zweiten und vierten Hund stammten *Ixodes* spp. mit einer erhöhten Prävalenz für Anaplasmataceae. Dabei wiesen die Zecken des zweiten Hundes eine doppelt so hohe Prävalenz für diese Erreger auf, während die Zecken des vierten Hundes eine um das dreifache erhöhte Prävalenz im Vergleich zur Prävalenz aller auf diese Erreger

untersuchten Zecken aufwiesen. Für diese Hunde ist eine Infektion mit Anaplasmataceae wahrscheinlich. Diese Untersuchungen sind jedoch keinesfalls beweisend für eine Infektion der Hunde, sondern liefern lediglich Hinweise. Die geringe Anzahl von 4 Hunden auf die die Auswahlkriterien zutrafen, lässt keine allgemein gültige Aussage zu. Interessant wäre es, weitergehende Untersuchungen an den 4 betroffenen Hunden durchzuführen. Dazu sind serologische und PCR-Untersuchungen denkbar.

Die Darstellung der Infektionshäufigkeiten der einzelnen Zeckenspezies über die Zeit in absoluten Zahlen ließ vermuten, dass ein Unterschied in der jahreszeitlichen Verteilung herrschte. Auch anhand der Gesamtzahl der pro Monat abgegebenen Zecken ließ sich eine Unterscheidung in zwei Jahresabschnitte der Zeckensaison ablesen. Durch die Verdeutlichung der Infektionsraten in Anteilswerten an insgesamt im Monat abgegebenen Zecken konnte ein differenzierteres Bild gegeben werden und eine ungefähr gleiche Verteilung der Infektionsraten der Zecken über das Jahr wurde damit bewiesen. Bei der Betrachtung der einzelnen Monate ergab sich jedoch durch die teils nur sehr geringen Zahlen an abgegebenen Zecken ein verfälschtes Bild, da diese bei einer vorliegenden Infektion den Anteilswert der Infektionsraten stark beeinflussten. Es wäre wünschenswert gewesen, insbesondere bei Erregern mit niedrigen Prävalenzen eine Anteilsberechnung auf Basis einer höheren Anzahl abgegebener Zecken durchführen zu können. Hier zeigt sich die nur begrenzt mögliche Interpretation von Feldstudien.

Der jahreszeitliche Verlauf der Aktivität der unterschiedlichen Zeckenspezies wurde in Abb. 24 (Beck, 2012) als Anzahl der insgesamt abgegebenen Zecken je Spezies pro Monat dargestellt. Dieser Verlauf spiegelt die Biologie von *I. hexagonus* wider. Durch die Nestwärme ist diese Zeckenspezies ganzjährig aktiv und wird deshalb, neben leicht erhöhter Aktivität im Herbst und Frühjahr, in ungefähr gleichem Maße in allen Monaten des Jahres angetroffen (Beichel et al., 1996). Hunde, die regelmäßigen Auslauf in urbanen Parkanlagen haben, sind besonders oft von dieser Zeckenart befallen, da sich hier viele der Zwischenwirte aufhalten (Ogden et al., 2000). Der jahreszeitliche Verlauf der Kurve für *I. ricinus* deckt sich ebenfalls ungefähr mit den zu dieser Spezies bekannten Daten. Normalerweise wird von einem besonders hohen Vorkommen in den Monaten April und Mai berichtet, danach sinkt das Vorkommen von *I. ricinus*, um im September wieder einen leichten Anstieg zu erfahren (Beichel et al., 1996). Auch der Kurvenverlauf für *D. reticulatus* passt zum bekannten jahreszeitlichen Aktivitätsmuster dieser Zeckenspezies, welches zwei Höhepunkte erreicht. Der erste Höhepunkt von Februar/März-Mai/Juni wird gefolgt von einem zweiten in den Monaten August/September-November/Dezember (Barutzki et al., 2007).

Aus diesem biphasischen Kurvenverlauf ergab sich die Frage, ob Erregerprävalenzen ebenfalls eine biphasische Verteilung über das Jahr aufweisen. Diese Verteilung über das Jahr wurde durch statistische Berechnungen des Unterschiedes von Infektionsraten in der ersten und zweiten Jahreshälfte durchgeführt. Dabei ergab sich für *I. ricinus* mit *Borrelia* spp. eine signifikant höhere Infektionsrate ($p < 0,05$) in der ersten Jahreshälfte mit einer Prävalenz von 13,7 % im Vergleich zur zweiten Jahreshälfte mit einer Prävalenz von 6,8%. Bislang gibt es keine weiteren Studien, die diese Erkenntnis unterstützen. Dem Hinweis auf ein unterschiedliches jahreszeitliches Vorkommen von *Borrelia* spp. sollte in zukünftigen Studien nachgegangen werden. Die Betrachtung aller weiteren untersuchten Erregerspezies machte deutlich, dass die Verteilung von Erregerprävalenzen nicht an Jahreszeiten gebunden ist. Ein Grund dafür ist die lange Generationszeit der Zecken, die bei den hier untersuchten Spezies 1-4 Jahre beträgt (Deplazes et al., 2013). Bei transovariell oder transstadial übertragbaren Erregern wirkt sich dies in der Form aus, dass einmal infizierte Zecken über mehrere Jahreszeiten hinweg kontinuierlich infiziert bleiben.

5.3.1 Prävalenzen von *Babesia* spp.

Da es bereits einige Studien zu Prävalenzen von *Babesia* spp. in Europa gibt, kann ein Vergleich zu diesen gezogen werden. Mit Prävalenzen von 2,5 % und 3 % *Babesia* spp. in *I. ricinus* bzw. *I. hexagonus* wird in etwa dem entsprochen, was an Prävalenzen aus Europa bekannt ist. Dazu wurden folgende Infektionsraten von *I. ricinus* mit *Babesia* spp. veröffentlicht: 1 % in der Schweiz (n=1159) (Casati et al., 2006), 0,9 % in Norwegen (n=1908) (Oines et al., 2012), 1,6 % in Polen (n=3165) (Welc-Faleciak et al., 2012) und 7,4 % in Slowenien (n=135) (Duh et al., 2001). Die im Zuge der jetzigen Studie nachgewiesenen Spezies von *Babesia* in *I. ricinus* konnten zu 1,5 % *B. microti* sowie zu je 0,5 % *B. venatorum* und *B. capreoli* zugeordnet werden. Alle 3 positiven Proben von *I. hexagonus* ließen sich *B. venatorum* zuordnen. Auch das Vorkommen dieser Spezies spiegelt sich in der Literatur wider. Die Prävalenz in geflaggt und von Nagern abgesammelten *I. ricinus* aus Leipzig betrug 4,1 % (n=539), darunter *B. microti*, *B. capreoli* und *B. venatorum* (Silaghi et al., 2012). Holländische *I. ricinus* wiesen eine Prävalenz von 1,2 % für *B. venatorum* und je 0,4 % für *B. divergens* und *B. microti* auf (n=251). In *I. hexagonus* aus derselben Studie (n=237) ließen sich keine *Babesia* spp. finden (Nijhof et al., 2007). Das Vektorpotential von *I. hexagonus* konnte in Versuchen nicht bestätigt werden (Walter, 1982). Dennoch ließen sich *Babesia* spp. in dieser Zeckenart nachweisen, demnach sind *I. hexagonus* zumindest als möglicher Reservoirwirt für *Babesia* spp. anzusehen. Die identifizierten *B. microti* und *B. venatorum* gelten als Zoonoseerreger, eine Pathogenität für den Hund konnte bislang nicht bewiesen werden. Auch zur Pathogenität von *B. capreoli* für Hunde ist bislang nichts bekannt.

5.3.2 Prävalenzen von *Rickettsia* spp.

Im Gegensatz zu den für *Babesia* spp. erhobenen Prävalenzen lässt sich in dieser Studie ein deutlicher Unterschied zu den bisher in Deutschland veröffentlichten Prävalenzen von *Rickettsia* spp. erkennen. Lagen diese bei 23 % (n=135) (Dautel et al., 2006) und 30 % (n=666) (Pluta et al., 2010) in *D. reticulatus* sowie 5,3 % (n=2861) (Silaghi et al., 2008), 8 % (n=3591) (Dobler und Wölfel, 2009) und 14,2 % (n=127) (Pichon et al., 2006) in *I. ricinus*, so wird durch die in der jetzigen Studie ermittelten Prävalenzen von je 61 % für *I. ricinus* (n=205) und 39 % für *D. reticulatus* (n=272) sowie 44 % in *I. hexagonus* (n=151) deutlich, dass *Rickettsia* spp. hierzulande weiter verbreitet sind als bisher angenommen wurde. Zu *I. hexagonus* sind Prävalenzen von *R. helvetica* aus Holland mit 0,8 % (n=273) bekannt (Nijhof et al., 2007). Bis auf eine Prävalenz von 67 % (n=299) *Rickettsia* spp. in *I. ricinus* aus Bulgarien (Christova et al., 2003) liegen in Europa beschriebene Prävalenzen mit 3,2 % (n=3059) in Spanien (Fernandez-Soto et al., 2004) und 16 % (n=521) in Frankreich (Halos et al., 2006) weit unter den Prävalenzen, die in der jetzigen Studie erhoben wurden. Ähnliches gilt für Prävalenzen von *Rickettsia* spp. in *D. reticulatus*, die in Kroatien eine Prävalenz von 12 % (n=100) aufwiesen (Dobec et al., 2009). Die in der jetzigen Studie ermittelten Genospezies waren in *I. ricinus* ausnahmslos *R. helvetica*, für die Proben von *D. reticulatus* ausnahmslos *R. raoulti* und für *I. hexagonus* *R. helvetica* (37,4 %), *R. monacensis* (4,2 %) und *R. raoulti* (2,3 %). Diese Verteilung stimmt für *I. ricinus* und *D. reticulatus* mit den aus der Literatur bekannten Daten aus Deutschland überein. In *D. reticulatus* ist die vorherrschende Genospezies *R. raoulti* (Dautel et al., 2006), in *I. ricinus* stellt dies *R. helvetica* (Silaghi et al., 2008; Dobler und Wölfel, 2009) dar. *Rickettsia monacensis* ließ sich bislang vor allem in *I. ricinus* nachweisen (Silaghi et al., 2008; Dobler und Wölfel, 2009). Die unerwartet hohen Prävalenzen von *Rickettsia* spp. in Berliner Zecken sind insbesondere im Hinblick auf das zoonotische Potential der Erreger von Wichtigkeit, da alle drei ermittelten Genospezies, wenn auch nur selten, in Zusammenhang mit menschlichen Erkrankungen gebracht wurden (Richter et al., 2002; Dobler und Wölfel, 2009; Parola et al., 2009; Nilsson et al., 2010; Rieg et al., 2011). Dies lässt vermuten, dass ein hoher Anteil an humanen Rickettsiosen unerkannt bleibt oder sich die vorhandenen Genospezies in humanpathogene und nicht humanpathogene Gruppen unterteilen lassen. Zur Pathogenität der in dieser Studie nachgewiesenen *Rickettsia* spp. für Hunde ist nichts bekannt.

5.3.3 Prävalenzen von Anaplasmataceae

Für Menschen und Hunde pathogene Anaplasmataceae wurden mit einer Prävalenz von 10,7 % in *I. ricinus* (n=774) und 9,9 % in *I. hexagonus* (n=152) nachgewiesen. Es konnten zwei Spezies detektiert werden. *A. phagocytophilum* war in 6,5 % der *I. ricinus* und 3,9 % der *I. hexagonus* enthalten. *Cand. Neoehrlichia mikurensis* dagegen fand sich in 4,3 % der *I. ricinus* und in 5,9 % von *I. hexagonus*. Die bisher in Deutschland erhobenen Prävalenzen ähneln denen aus dieser Studie, sie reichen von 2,2 bis 6,5% für *A. phagocytophilum* (Baumgarten et al., 1999; Fingerle et al., 1999; Hildebrandt et al., 2002; von Loewenich et al., 2003; Hartelt et al., 2004; Leonhard, 2005; Pichon et al., 2006; Silaghi et al., 2008; Richter und Matuschka, 2012). Doch auch höhere Prävalenzen von 13,3 % (n=146) (Schorn et al., 2011) und 8,7 % (n=539) (Silaghi et al., 2012) wurden innerhalb der letzten zwei Jahre in Süddeutschland beschrieben. Mit einer Prävalenz 8,1 % (n=542) für *Cand. Neoehrlichia mikurensis* in *I. ricinus* decken sich die Ergebnisse von Richter und Matuschka (2012) mit den hier ermittelten Prävalenzen in Berliner Zecken. Die bisher veröffentlichten europäischen Prävalenzen für *A. phagocytophilum* liegen bei 1,6 % für *I. ricinus* (n=251) und 5,9 % für *I. hexagonus* (n=237) aus Holland (Nijhof et al., 2007), 2 % (n=465) in *I. ricinus* aus der Schweiz (Burri et al., 2011), 10,7 % (n=684) in Polen (Chmielewska-Badora et al., 2007), 15 % (n=4701) in Frankreich (Halos et al., 2006), 24,4 % (n=86) in Italien (Cinco et al., 1997), 10 % (n=257) in Spanien (Portillo et al., 2011) und 1,3-15 % (n=1245) in Schweden (Severinsson et al., 2010). Da alle *I. hexagonus* mittels HRM ohne die zusätzliche Durchführung einer konventionellen PCR auf Anaplasmataceae untersucht wurden, kann diskutiert werden, ob die für diese Erreger in *I. hexagonus* erhobenen Prävalenzen der tatsächlichen Prävalenz entsprechen, da die HRM mit 100 Kopien Nachweisgrenze etwas weniger sensitiv agiert als die konventionelle PCR mit 20 Kopien. Andererseits ergab der Vergleich beider Methoden eine 100%ige Übereinstimmung für alle 37 mittels beider Methoden untersuchten Proben, was eine hinreichende Sensitivität der HRM Analyse zeigt. Die im Zuge der HRM beobachtete Linksverschiebung in der Schmelzkurve für eine koinfizierte Probe könnte daher rühren, dass sich Heteroduplexe von DNA-Abschnitten für *A. phagocytophilum* und *Cand. Neoehrlichia mikurensis* bilden. Da diese Heteroduplexe nicht zu 100 % zueinander passen, schmelzen sie bei früheren Temperaturen auf. Für *A. phagocytophilum* und *Cand. Neoehrlichia mikurensis* ist nicht nur für den Menschen, sondern auch für den Hund eine Pathogenität bewiesen worden (Fehr et al., 2010; Diniz et al., 2011), daher kann von einem vorhandenen Risiko für die Berliner Hundepopulation ausgegangen werden. *Cand. Neoehrlichia mikurensis* ist erst seit wenigen Jahren als pathogener Erreger bekannt und gilt somit als neu auftretender Infektionserreger ("emerging infectious disease") (von Loewenich et al., 2010).

5.3.4 Prävalenzen von *Borrelia* spp.

Die für *Borrelia* spp. ermittelten Prävalenzen entsprechen in etwa dem, was in bereits angesprochenen europäischen Studien veröffentlicht wurde. Lagen europaweit die Prävalenzen in einer Größenordnung von 7,6-40 % (Christova et al., 2003; Wielinga et al., 2006), konnte in dieser Studie mittels Nachweis des *hbb* Gens eine Prävalenz von 11,2 % in *I. hexagonus* (n=152) und 11,6 % in *I. ricinus* (n=768) erhoben werden. *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. burgdorferi* s.s. gehören den Erregern der Lyme-Borreliose an und stellen somit Pathogene für den Menschen dar (Stanek et al., 2012). Für den Hund sind Erkrankungen lediglich durch *B. burgdorferi* s.s. und *B. garinii* beschrieben (Baranton et al., 1992; Hovius et al., 1999; Inokuma et al., 2013), die Pathogenität von *B. afzelii* für den Hund ist fraglich (Inokuma et al., 2013). Für den Rückfallfiebererreger *B. miyamotoi* sind bisher keine Krankheitsfälle beim Hund beschrieben. Für den Menschen kann dieser Erreger jedoch gefährlich werden (Platonov et al., 2011). *B. miyamotoi* stellt für die Berliner Umgebung einen relativ neuen Erreger dar, der bislang nur zweimal in Deutschland festgestellt (Richter et al., 2003; Richter und Matuschka, 2012) und nach Autorenkenntnis hier erstmalig in *I. hexagonus* nachgewiesen wurde.

5.3.5 Koinfektionen

Die Untersuchungen zum Vorkommen von Koinfektionen ergaben eine Rate von 20 % in *I. ricinus* (n=170) und 15 % in *I. hexagonus* (n=100). Dies verdeutlicht, dass auch bei den befallenen Hunden mit Koinfektionen durch mehrere Erreger gerechnet werden muss. Die Tatsache, dass in *D. reticulatus* (n=140) keine Koinfektionen festgestellt wurden, hängt damit zusammen, dass diese Zeckenspezies lediglich auf zwei Infektionserreger getestet wurde. Doch das mit 0-2,12 % breite 95 % Konfidenzintervall zeigt an, dass die geringe Anzahl (n=140) der auf beide Erreger untersuchten *D. reticulatus* ebenfalls die Ergebnisse beeinflusst. Koinfektionen bei Hunden können atypische Krankheitsbilder zur Folge haben, die in Diagnostik und Therapie Schwierigkeiten bereiten (Breitschwerdt et al., 1998). Der signifikante Zusammenhang zwischen mit *A. phagocytophilum* infizierten *I. ricinus* und der Wahrscheinlichkeit, dass diese auch mit *Rickettsia* spp. infiziert sind, wurde in dieser Studie belegt. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Prävalenzen für *Rickettsia* spp. im Vergleich zu *A. phagocytophilum* sehr hoch waren und der statistisch ermittelte Zusammenhang ein zufälliges Artefakt darstellt. Dazu passt auch, dass kein ähnlicher Zusammenhang in *I. hexagonus* festgestellt wurde. Andere mögliche Erklärungen sind die gleichen Reservoirwirte der beiden Erreger, da diese ebenfalls koinfiziert sein könnten (Reye et al., 2010). *I. ricinus* kann jedoch als dreiwirtige Zecke mehr als eine Erregerspezies von einem oder mehreren Wirten empfangen (Severinsson et al., 2010) und Koinfektionen mit *A. phagocytophilum* und *Rickettsia* spp. sind vielfach beschrieben (Hartelt et al., 2004; Movila et al., 2009; Hildebrandt et al., 2010; Reye et al., 2010; Severinsson et al., 2010; Schorn et al., 2011). Noch unbestätigt ist die Vermutung, dass eine größere Empfänglichkeit einer Zecke für einen Erreger bestehen könnte, wenn sie mit dem anderen bereits infiziert ist.

Ein Kritikpunkt an der Studie ist die geringe Schnittmenge der auf alle Erreger untersuchten Zecken, die bei anderem Studiendesign und durch Verursachung weiterer Kosten sinnvoller hätte ausgeschöpft werden können. So hätte man eine größere Menge von auf alle Erreger untersuchten Proben erhalten und die statistische Verwertbarkeit wäre besser gewesen.

5.4 Schlussfolgerungen

Die Besonderheit dieser Studie ist die Untersuchung von wirtsassoziierten Zecken. Diese stellen im Gegensatz zu geflaggtten Zecken eine konkrete Gefahr für die Wirte dar und geben dadurch mehr Aufschluss über deren Infektionsrisiko. Im Vergleich zu Studien, in denen Zecken mittels Flaggen-Methode gesammelt werden, ist im Zuge dieser Studie die Sammlung einer ähnlichen Anzahl von Zecken mit mehr Aufwand verbunden. Anders als mit der Flaggen-Methode können nur relativ wenige Zecken in einem größeren Zeitabstand gesammelt werden, da sich im Normalfall nur eine geringe Anzahl von Zecken auf einem Hund befinden. Im Gegensatz dazu ist es je nach Jahreszeit und Fanggebiet möglich mehrere hunderte Zecken mittels Flaggenmethode innerhalb eines kurzen Zeitraums zu sammeln (Deplazes et al., 2013). Um Zecken von Hunden abzusammeln mussten Hilfspersonen, in diesem Fall die Hundebesitzer, gebeten werden, mitzuarbeiten. Dabei musste damit gerechnet werden, dass Zecken übersehen wurden. Aber auch eine mangelnde Motivation der Hundebesitzer konnte zur Unterlassung des Sammelns aller am Hund befindlichen Zecken führen. Die Vorteile, die diese Studie im Gegensatz zu Studien mit Flaggenmethode bietet, stellen neben der größeren Aussage zum Infektionsrisiko durch den direkten Wirtkontakt auch die großflächige Sammlung von Zecken aus unterschiedlichen Gebieten dar. Während des Flaggens können immer nur bestimmte Gebiete auf Zecken und deren Infektionsstatus untersucht werden. Durch die Untersuchung von Hunden dieser Studie auf Zecken konnte eine weit größere Region auf ihr Risikopotential hin eingeschätzt werden, da die Hunde unterschiedliche Auslaufgebiete besaßen und die Zecken daher aus unterschiedlichen Teilen Berlins und seiner Umgebung stammten. Ein weiterer wichtiger Vorteil, den diese Studie im Vergleich zu vielen anderen bietet, ist die Erfassung des

Saugstatus der gesammelten Zecken, der ein deutliches Bild über Gefährdung der Hunde durch die Zecken liefert.

Die Ergebnisse dieser Studie sind nicht nur für die Berliner Hundepopulation von Bedeutung, sondern zeigen, dass diese Zecken auch für den Menschen eine reale Gefahr darstellen. Denn die in der Studie untersuchten Zeckenspezies, vor allem *I. ricinus* und *I. hexagonus*, weisen ein breites Wirtsspektrum auf und befallen auch den Menschen. Hunde können durch das Einschleppen von *I. hexagonus*, die in der Behausung des Wirtes nisten, den Kontakt zum Menschen herstellen, der dadurch ebenfalls zum potentiellen Wirt wird. Die Übertragbarkeit vom Hund auf den Menschen gilt zwar nur bedingt, jedoch ist die Idee, Hunde als "Sentinels" für humanpathogene Erreger zu nutzen, bereits vielfach diskutiert worden. Der Begriff "Sentinel" bezeichnet dabei den Hund als Indikator für zeckenübertragene Erkrankungen des Menschen. Erstmals wurden in Massachusetts Hunde als "Sentinels" für Lyme-Borreliose Erkrankungen des Menschen genutzt (Lindenmayer et al., 1991). Auch in anderen US-amerikanischen Staaten sowie im Vereinigten Königreich wurden Hunde als "Sentinels" für die Erreger der Lyme-Borreliose genutzt (Falco et al., 1993; Olson et al., 2000; Duncan et al., 2005; Smith et al., 2012). Diese hielten sich in derselben Umgebung wie ihre Besitzer auf und waren somit einer ähnlichen Infektionsgefahr ausgesetzt. Da großangelegte Seroprävalenzstudien beim Menschen einen zeit- und kostenintensiven Aufwand bedeuten, wurde sich des Hundes als "Sentinel" bedient, auch wenn dieser die Situation für den Menschen nur ungefähr widerspiegelt.

Die Untersuchungen zum SI in Verbindung mit den nachgewiesenen hundepathogenen Infektionserregern machen deutlich, dass eine Verbesserung der Zeckenprophylaxe von Berliner Hunden notwendig ist, um Infektionen zu verhindern. Dazu ist ein einmal tägliches Absuchen von Hunden auf Zecken nicht ausreichend, wie in dieser Studie gezeigt wurde. Um Infektionen durch zeckenübertragenen Infektionserregern Einhalt zu gebieten, spielt eine wirksame Chemoprophylaxe gegen Zecken eine wichtige Rolle. Doch offenbar wendet ein Großteil der Hundebesitzer Mittel zur Zeckenprophylaxe falsch an (Beck, 2012). An dieser Stelle ist die Entwicklung leicht anzuwendender Antiparasitika sowie genaues Einweisen von Hundebesitzern zum Umgang mit diesen gefragt. Weiterhin ist ein sorgsames Abwägen vor der Verbringung von Hunden in Länder mit anderem Erregerspektrum anzuraten. Dabei geht es nicht nur um den Schutz des Einzeltieres, sondern insbesondere um die Verhinderung einer weiteren Verbreitung von Erregern (Baneth et al., 2012).

Da es sich nicht um eine experimentelle Studie handelt, ist eine prinzipielle Übertragbarkeit auf die restliche Berliner Hundepopulation gegeben. Gearbeitet wurde mit Besitzerbefragungen und Zeckenuntersuchungen. Um ein vollständiges Bild der Gefahrenlage für die an der Studie teilnehmenden Hunde zu erhalten, hätten diese im Studienzeitraum serologisch und/ oder mittels PCR untersucht werden müssen. Denn obwohl Zecken einen Eindruck vom Infektionsstatus der Hunde geben, können ihre Prävalenzen nicht mit denen der Hunde gleichgesetzt werden. Es bestehen drei Möglichkeiten, die eine fehlerhafte Einschätzung hervorrufen können. Zecken können sich an anderen Wirten infiziert haben, ohne Erreger auf den befallenen Hund zu übertragen. Weiterhin können Zecken, die in der PCR-Untersuchung erregerefrei erscheinen, einen Großteil der vormals in ihnen enthaltenen Erreger bereits auf den Hund übertragen haben. In diesem Fall liegt eine Infektion des Hundes durch die Zecke vor, obwohl keine Erreger in ihr nachgewiesen wurden (Sood et al., 1997). Eine weitere Möglichkeit ist das Vorhandensein von Erreger-DNA in der Zecke, ohne dass diese eine Vektorfunktion ausübt. Dennoch ist diese Studie als Anhaltspunkt für weitere Studien von Prävalenzen in Zecken aber auch Seroprävalenzstudien zu nutzen, um eine bessere Risikoeinschätzung zu gewährleisten. Der Nachweis der neuartigen Erreger *Cand. Neoehrlichia mikurensis* und *B. miyamotoi* unterstreicht die Notwendigkeit des kontinuierlichen Monitorings von Zeckenpopulationen sowie der Suche nach weiteren neuartigen Erregern. So können durch Koinfektionen oder neuartige Erreger bedingte klinisch unklare Fälle in Zukunft besser eingeschätzt werden.

Dabei ist eine multidisziplinäre Herangehensweise von Vorteil, da neben tiermedizinisch relevanten Studien auch humanmedizinische Studien im Themenkomplex der Vektorenkrankheiten von Interesse sind. Zudem ist es sinnvoll, aktuelle Erregerprävalenzen in Nagern und anderen möglichen Zwischenwirten in Berlin und Umgebung zu erheben, um einen Anhaltspunkt für zukünftige experimentelle Studien zur Ermittlung der Erregerbiologie zu erhalten. Um eine statistische Auswertbarkeit zu erreichen und dadurch eine große Aussagekraft der Studienergebnisse zu gewinnen, sollte dabei mit einer wesentlich höheren Probenanzahl gearbeitet werden. Durch Methoden wie die in dieser Studie etablierte HRM für den Nachweis der Anaplasmataceae und neue Erkenntnisse bezüglich Gensequenzen von gesuchten Erregern wird die Durchführbarkeit und die Finanzierbarkeit solcher zukünftiger Studien verbessert.

6 Zusammenfassung

Zeckenübertragene Infektionserreger bei Hunden im Raum Berlin und Brandenburg: Prävalenzen und Untersuchungen zum Infektionsrisiko

Vektorübertragene Krankheiten stellen ein wichtiges Teilgebiet der klinischen Tiermedizin bei Hunden dar. Dabei spielen Zecken als Vektoren verschiedener Infektionserreger eine große Rolle. Ihre Ausbreitung wird unter anderem durch den zunehmenden Reiseverkehr von Tieren, das Ausbleiben langer harter Winter und die Renaturierung landwirtschaftlicher Nutzflächen gefördert. Zudem stellen neu aufkommende Infektionserreger sowie das Vorkommen von Koinfektionen Herausforderungen für die tierärztliche Praxis dar.

Um Informationen über die Gefährdung Berliner Hunde durch zeckenübertragene Infektionserreger zu gewinnen, war Zielstellung dieser Dissertation die Ermittlung von Prävalenzen der Erregergruppen *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., Anaplasmataceae und *Borrelia* spp. in von Hunden abgesammelten Zecken, verbunden mit der Erfassung des Scutal Index (SI) als Maß für die Dauer der Blutmahlzeit einer jeden Zecke.

Die untersuchten Zecken stammen aus einer Umfrage- und Sammelstudie, durchgeführt im Zeitraum März 2010 bis April 2011 an der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin (Beck, 2012). Studienteilnehmer mit ihren Hunden aus Berlin und Umgebung wurden im Lauf der Vorgängerstudie akquiriert und reichten Zecken der Spezies *I. ricinus*, *I. hexagonus* und *D. reticulatus* ein. Der SI von 1694 Zecken wurde ermittelt, der Erregernachweis fand bei 1255 Zecken mittels PCR und Sequenzierung oder High Resolution Melting Curve Analysis (HRM) statt.

Über 40 % der untersuchten weiblichen *I. ricinus* (n=480) und über 60 % (n=647) der untersuchten weiblichen *D. reticulatus* wurden aufgrund der SI-Ergebnisse erst nach ca. zweitägiger Blutmahlzeit gefunden und entfernt. Weibliche Zecken wiesen einen signifikant höheren SI und eine höhere Infektionsrate auf als männliche Zecken ($p < 0,001$). Weiterhin ließ sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Felllänge der Hunde und SI für die Spezies *D. reticulatus* erkennen ($p < 0,05$). Für die anderen Spezies war dieser Zusammenhang nicht statistisch signifikant. Es bestand außerdem eine positive Korrelation zwischen dem SI und der Wahrscheinlichkeit enthaltener Infektionserreger in Zecken ($p < 2,2 \times 10^{-7}$). Die Prävalenzen für *Babesia* spp. lagen bei 2,5 % (KI: 0,92-5,45 %) für *I. ricinus* und 3 % (KI: 0,77-7,95 %) für *I. hexagonus*, darunter die Spezies *B. microti*, *B. venatorum* und *B. capreoli*. *Rickettsia* spp. wurden mit einer Prävalenz von 61 % (KI: 54,2-67,5 %) in *I. ricinus* und 39 % (KI: 33,7-45,2 %) in *D. reticulatus* sowie 44 % (KI: 36,6-52,4 %) in *I. hexagonus* nachgewiesen. Die zur Genospeziesdifferenzierung untersuchten Proben ergaben den Nachweis von *R. helvetica*, *R. raoulti* und *R. monacensis*. Die Untersuchung auf Erreger der Gruppe der Anaplasmataceae ergab eine Prävalenz von 6,5 % (KI: 4,9-8,4 %) und 3,9 % (KI: 1,6-8,0 %) *A. phagocytophilum* in *I. ricinus* bzw. *I. hexagonus*. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* wurde in 4,3 % (KI: 3,0-5,9 %) der *I. ricinus* sowie in 5,9 % (KI: 2,9-10,6 %) der *I. hexagonus* nachgewiesen. Die ermittelten Prävalenzen für *Borrelia* spp. lagen in *I. ricinus* bei 11,6 % (KI: 9,5-14,0 %) und in *I. hexagonus* bei 11,2 % (KI: 6,9-17,0 %). Die Genospezies waren hierbei *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto und *B. miyamotoi*. Eine Koinfektionsrate von 20 % (KI: 14,5-26,5 %) in *I. ricinus* und 15 % (KI: 9,0-23,0 %) in *I. hexagonus* sowie eine Gesamtinfektionsrate von 65 % (KI: 57,9-72,2 %) in *I. ricinus*, 59 % (KI: 39,2-68,3 %) in *I. hexagonus* und 64 % (KI: 55,4-71,2 %) in *D. reticulatus* wurde ermittelt.

Die im Laufe der Studie erhobenen Prävalenzen im Zusammenhang mit der berechneten Dauer der Blutmahlzeit der untersuchten Zecken geben deutliche Hinweise darauf, dass Berliner Hunde einem nicht zu unterschätzenden Infektionsrisiko ausgesetzt sind. Prophylaxemaßnahmen werden offenbar nur unzureichend durchgeführt und müssen

demnach verbessert werden. Das breite Wirtsspektrum von *I. ricinus* und *I. hexagonus* verleiht den Ergebnissen zudem eine humanmedizinische Relevanz. Neuartige Erreger wie *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* und *B. miyamotoi* konnten nachgewiesen werden und belegen die Notwendigkeit eines kontinuierlichen Monitorings von Zeckenpopulationen bezüglich enthaltener Infektionserreger. Dazu wurde durch die im Zuge der Studie etablierte Methode der HRM ein hilfreiches diagnostisches Mittel geschaffen.

7 Summary

Infectious agents in ticks collected from dogs in urban and suburban areas of Berlin/Brandenburg: Prevalence and risk of infection

Vectorborne diseases are an important part of the clinical veterinary medicine of dogs. For these diseases ticks play a major role as vectors of different infectious agents. The spreading of ticks is enhanced by an increased transport of animals across country borders, the absence of cold and long winters as well as the re-naturation of agricultural areas. Today, the emergence of infectious diseases as well as the appearance of coinfections pose a challenge during the clinical work of veterinarians.

To gather information about the current risk for dogs regarding tick-borne diseases this study focused on the detection of four groups of pathogens: *Babesia* spp, *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp. and Anaplasmataceae. All examined ticks were collected from dogs living in Berlin and Brandenburg. As part of the risk analysis, scutal indices (SI) were determined for each tick in order to obtain a rough estimation of duration of feeding.

All analysed ticks were collected between March 2010 and April 2011 in the course of a previous study regarding tick control and infestation patterns of dogs at the Small Animal Clinic of the Freie Universität Berlin (Beck, 2012) (Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin). During the study participants collected *I. ricinus*, *I. hexagonus* and *D. reticulatus* ticks from their dogs. These ticks were used for SI measurements (1693 ticks) and the detection of infectious agents (1255 ticks) by means of PCR, sequencing, or High Resolution Melting Curve Analysis (HRM).

According to SI measurements, over 40% of examined female *I. ricinus* (n=480) and over 60% (n=647) of examined female *D. reticulatus* were removed after a feeding time of at least two days. Female ticks had a significantly higher SI than males ($p < 0.001$). Furthermore, a significant correlation between the fur length of the dogs and the SI of the tick species *D. reticulatus* was discovered ($p < 0.05$). SI of ticks and the probability of an infection correlated positively ($p < 2.2 \times 10^{-7}$). Prevalences of *Babesia* spp. in *I. ricinus* and *I. hexagonus* were found to be as high as 2.5% (CI: 0.92-5.45%) and 3% (CI: 0.77-7.95%) respectively, sequencing revealed *B. microti*, *B. capreoli* and *B. venatorum*. *Rickettsia* spp. infected 61% (CI: 54.2-67.5%) of *I. ricinus* and 39% (CI: 33.7-45.2%) of *D. reticulatus* as well as 44% (CI: 36.6-52.4%) of *I. hexagonus*. Detected genospecies were *R. helvetica*, *R. raoulti*, and *R. monacensis*. Of all examined *I. ricinus* ticks, 6.5% (CI: 4.9-8.4%) and 4.3% (CI: 3.0-5.9%) were infected by *A. phagocytophilum* and *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, respectively. Examined *I. hexagonus* had a prevalence of 3.9% (CI: 1.6-8.0%) for *A. phagocytophilum* and 5.9% (CI: 2.9-10.6%) for *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. Prevalences for *Borrelia* spp. were found to be as high as 11.6% (CI: 9.5-14.0%) in *I. ricinus* and 11.2% (CI: 6.9-17.0%) in *I. hexagonus*. *Borrelia* spp. were identified as *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto and *B. miyamotoi*. Coinfections were found in 20% (CI: 14.5-26.5%) of *I. ricinus* and in 15% (CI: 9.0-23.0%) of *I. hexagonus* whereas the total prevalence of any infection was 65% (CI: 57.9-72.2%) in *I. ricinus*, 59% (CI: 39.2-68.3%) in *I. hexagonus* and 64% (CI: 55.4-71.2%) in *D. reticulatus*.

The determined prevalences in combination with the estimated duration of feeding of ticks examined during this study point out that dogs in Berlin and Brandenburg are exposed to a relatively high infection risk. Prophylactic approaches are obviously often not performed correctly and recommendations therefore need to be improved. The broad host spectrum of *I. ricinus* and *I. hexagonus* underlines that the findings of the study are also relevant for human medicine. Emerging infectious disease agents such as *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and *B. miyamotoi* were detected within this study and underline the importance of continuous monitoring of tick populations regarding the occurrence of infectious pathogens.

The newly developed HRM method may serve as a valuable diagnostic tool during such surveys.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
bp	Basenpaare
Cand.	Candidatus
cm	Centimeter
ca.	circa
d.h.	das heißt
<i>D. reticulatus</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
°C	Grad Celsius
g	Fallbeschleunigung
h	Stunde(n)
HRM	High Resolution Melting Curve Analysis
HGA	Humane Granulozytäre Anaplasiose
<i>IGS</i>	Intergenetic Spacer
k	Kilo (10^3)
KI	95 % Konfidenzintervall
l	Liter
max.	maximal
μ	Mikro (10^{-6})
mm	Millimeter
m	Minute(n)
M	Molar
n	Nano (10^{-9})
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
s	Sekunden
sp.	Species

Abkürzungen

spp.	Species pluralis
Tab.	Tabelle
TIBOLA	tick-borne lymphadenitis (zeckenübertragene Lymphadenitis)
U	Unit (Einheit)
USA	United States of America (Vereinigte Staaten Amerikas)

8.2 Literaturverzeichnis

Adaszek, L. and Winiarczyk, S. (2008). "Molecular characterization of *Babesia canis canis* isolates from naturally infected dogs in Poland." Veterinary Parasitology, **152** (3-4): 235-241.

Aguirre, E., Tesouro, M. A., Ruiz, L., Amusatogui, I. and Sainz, A. (2006). "Genetic characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in dogs in Spain." Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health, **53** (4): 197-200.

Alekseev, A. N., Dubinina, H. V., Van De Pol, I. and Schouls, L. M. (2001). "Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia." Journal of Clinical Microbiology, **39** (6): 2237-2242.

Allsopp, M. T., Louw, M. and Meyer, E. C. (2005). "*Ehrlichia ruminantium*-an emerging human pathogen." South African Medical Journal, **95** (8): 541.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). "Basic local alignment search tool." Journal of Molecular Biology, **215** (3): 403-410.

Anda, P., Sanchez-Yebra, W., del Mar Vitutia, M., Perez Pastrana, E., Rodriguez, I., Miller, N. S., Backenson, P. B. and Benach, J. L. (1996). "A new *Borrelia* species isolated from patients with relapsing fever in Spain." Lancet, **348** (9021): 162-165.

Bakken, J. S. and Dumler, J. S. (2000). "Human granulocytic ehrlichiosis." Clinical Infectious Diseases, **31** (2): 554-560.

Baneth, G., Bourdeau, P., Bourdoiseau, G., Bowman, D., Breitschwerdt, E., Capelli, G., Cardoso, L., Dantas-Torres, F., Day, M., Dedet, J. P., Dobler, G., Ferrer, L., Irwin, P., Kempf, V., Kohn, B., Lappin, M., Little, S., Maggi, R., Miro, G., Naucke, T., Oliva, G., Otranto, D., Penzhorn, B., Pfeffer, M., Roura, X., Sainz, A., Shaw, S., Shin, S., Solano-Gallego, L., Straubinger, R., Traub, R., Trees, A., Truyen, U., Demonceau, T., Fitzgerald, R., Gatti, D., Hostetler, J., Kilmer, B., Krieger, K., Mencke, N., Mendao, C., Mottier, L., Pachnicke, S., Rees, B., Siebert, S., Stanneck, D., Mingote, M. T., von Simson, C., Weston, S. and Forum, C. W. (2012). "Vector-borne diseases--constant challenge for practicing veterinarians: recommendations from the CVBD World Forum." Parasites & Vectors, **5**: 55.

Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J. C., Assous, M. and Grimont, P. A. (1992). "Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis." International Journal of Systematic Bacteriology, **42** (3): 378-383.

Barbour, A. G. and Hayes, S. F. (1986). "Biology of Borrelia species." Microbiological Reviews, **50** (4): 381-400.

Barutzki, D., Reule, M., Scheulemann, R., Heile, C. and Schein, E. (2007). "Die Babesiose des Hundes - Eine autochtone Erkrankung in Deutschland." Deutsches Tierärzteblatt, **3**: 284-293.

Baumgarten, B. U., Röllinghoff, M. and Bogdan, C. (1999). "Prevalence of Borrelia burgdorferi and granulocytic and monocytic ehrlichiae in Ixodes ricinus ticks from southern Germany." Journal of Clinical Microbiology, **37** (11): 3448-3451.

Beck, R., Vojta, L., Mrljak, V., Marinculic, A., Beck, A., Zivicnjak, T. and Caccio, S. M. (2009). "Diversity of Babesia and Theileria species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia." International Journal for Parasitology, **39** (7): 843-848.

Beck, S. (2012). "Zeckenexposition und Zeckenprophylaxe bei Hunden im Raum Berlin/Brandenburg". Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere des Fachbereiches Veterinärmedizin. Berlin, Freie Universität Berlin. Dissertation. 52-147.

Becker, C. A., Bouju-Albert, A., Jouglin, M., Chauvin, A. and Malandrin, L. (2009). "Natural transmission of Zoonotic Babesia spp. by Ixodes ricinus ticks." Emerging Infectious Diseases, **15** (2): 320-322.

Beelitz, P., Schumacher, S., Marholdt, F., Pfister, K. and Silaghi, C. (2012). "The prevalence of Babesia canis canis in marsh ticks (Dermacentor reticulatus) in the Saarland." Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, **125** (3-4): 168-171.

Beichel, E., Petney, T. N., Hassler, D., Bruckner, M. and Maiwald, M. (1996). "Tick infestation patterns and prevalence of Borrelia burgdorferi in ticks collected at a veterinary clinic in Germany." Veterinary Parasitology, **65** (1-2): 147-155.

Beugnet, F. and Franc, M. (2012). "Insecticide and acaricide molecules and/or combinations to prevent pet infestation by ectoparasites." Trends in Parasitology, **28** (7): 267-279.

Beugnet, F. and Marie, J. L. (2009). "Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe." Veterinary Parasitology, **163** (4): 298-305.

Bexfield, N. H., Villiers, E. J. and Herrtage, M. E. (2005). "Immune-mediated haemolytic anaemia and thrombocytopenia associated with Anaplasma phagocytophilum in a dog." The Journal of Small Animal Practice, **46** (11): 543-548.

Birkenheuer, A. J., Levy, M. G. and Breitschwerdt, E. B. (2003). "Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples." Journal of Clinical Microbiology, **41** (9): 4172-4177.

Bjoersdorff, A., Svendenius, L., Owens, J. H. and Massung, R. F. (1999). "Feline granulocytic ehrlichiosis-a report of a new clinical entity and characterisation of the infectious agent." The Journal of Small Animal Practice, **40** (1): 20-24.

Bonnet, S., Jouglin, M., L'Hostis, M. and Chauvin, A. (2007). "*Babesia* sp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*." Emerging Infectious Diseases, **13** (8): 1208-1210.

Botelho-Nevers, E. and Raoult, D. (2011). "Host, pathogen and treatment-related prognostic factors in rickettsioses." European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, **30** (10): 1139-1150.

Bourdoiseau, G. (2006). "Canine babesiosis in France." Veterinary Parasitology, **138** (1-2): 118-125.

Bowman, D. D. (2011). "Introduction to the alpha-proteobacteria: *Wolbachia* and *Bartonella*, *Rickettsia*, *Brucella*, *Ehrlichia*, and *Anaplasma*." Topics in Companion Animal Medicine, **26** (4): 173-177.

Breitschwerdt, E. B., Blann, K. R., Stebbins, M. E., Munana, K. R., Davidson, M. G., Jackson, H. A. and Willard, M. D. (2004). "Clinicopathological abnormalities and treatment response in 24 dogs seroreactive to *Bartonella vinsonii* (berkhoffii) antigens." Journal of the American Animal Hospital Association, **40** (2): 92-101.

Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C. and Hancock, S. I. (1998). "Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*." Journal of Clinical Microbiology, **36** (9): 2645-2651.

Breitschwerdt, E. B. and Kordick, D. L. (2000). "*Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection." Clinical Microbiology Reviews, **13** (3): 428-438.

Brisson, D., Drecktrah, D., Eggers, C. H. and Samuels, D. S. (2012). "Genetics of *Borrelia burgdorferi*." Annual Review of Genetics: 513-534.

Brouqui, P., Sanogo, Y. O., Caruso, G., Merola, F. and Raoult, D. (2003). "Candidatus *Ehrlichia walkerii*: a new *Ehrlichia* detected in *Ixodes ricinus* tick

collected from asymptomatic humans in Northern Italy." Annals of the New York Academy of Sciences, **990**: 134-140.

Burri, C., Dupasquier, C., Bastic, V. and Gern, L. (2011). "Pathogens of emerging tick-borne diseases, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp., and *Babesia* spp., in ixodes ticks collected from rodents at four sites in Switzerland (Canton of Bern)." Vector Borne Zoonotic Diseases, **11** (7): 939-944.

Buss, S. N., Gebhardt, L. L. and Musser, K. A. (2012). "Real-time PCR and pyrosequencing for differentiation of medically relevant *Bartonella* species." Journal of Microbiological Methods, **91** (2): 252-256.

Caccio, S. M., Antunovic, B., Moretti, A., Mangili, V., Marinculic, A., Baric, R. R., Slemenda, S. B. and Pieniazek, N. J. (2002). "Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs." Veterinary Parasitology, **106** (4): 285-292.

Cadavid, D. and Barbour, A. G. (1998). "Neuroborreliosis during relapsing fever: review of the clinical manifestations, pathology, and treatment of infections in humans and experimental animals." Clinical Infectious Diseases, **26** (1): 151-164.

Camicas, J.-L., Hervy, J.-P., Adam, F. and Morel, P.-C. (1998). The Ticks of the World. Paris, Orstrom Editions. 1-233.

Cao, W. C., Zhao, Q. M., Zhang, P. H., Dumler, J. S., Zhang, X. T., Fang, L. Q. and Yang, H. (2000). "Granulocytic Ehrlichiae in *Ixodes persulcatus* ticks from an area in China where Lyme disease is endemic." Journal of Clinical Microbiology, **38** (11): 4208-4210.

Capelli, G., Ravagnan, S., Montarsi, F., Ciocchetta, S., Cazzin, S., Porcellato, E., Babiker, A. M., Cassini, R., Salviato, A., Cattoli, G. and Otranto, D. (2012). "Occurrence and identification of risk areas of *Ixodes ricinus*-borne pathogens: a cost-effectiveness analysis in north-eastern Italy." Parasites & Vectors, **5**: 61.

Cardoso, L., Costa, A., Tuna, J., Vieira, L., Eyal, O., Yisaschar-Mekuzas, Y. and Baneth, G. (2008). "*Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal." Veterinary Parasitology, **156** (3-4): 199-204.

Cardoso, L., Tuna, J., Vieira, L., Yisaschar-Mekuzas, Y. and Baneth, G. (2010). "Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal." Veterinary Journal, **183** (2): 232-233.

Carrade, D. D., Foley, J. E., Borjesson, D. L. and Sykes, J. E. (2009). "Canine granulocytic anaplasmosis: a review." Journal of Veterinary Internal Medicine, **23** (6): 1129-1141.

Carret, C., Walas, F., Carcy, B., Grande, N., Precigout, E., Moubri, K., Schetters, T. P. and Gorenflot, A. (1999). "Babesia canis canis, Babesia canis vogeli, Babesia canis rossi: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes." The Journal of Eukaryotic Microbiology, **46** (3): 298-303.

Casati, S., Sager, H., Gern, L. and Piffaretti, J. C. (2006). "Presence of potentially pathogenic Babesia sp. for human in Ixodes ricinus in Switzerland." Annals of Agricultural and Environmental Medicine, **13** (1): 65-70.

Chang, Y. F., Novosel, V., Chang, C. F., Summers, B. A., Ma, D. P., Chiang, Y. W., Acree, W. M., Chu, H. J., Shin, S. and Lein, D. H. (2001). "Experimental induction of chronic borreliosis in adult dogs exposed to Borrelia burgdorferi-infected ticks and treated with dexamethasone." American journal of veterinary research, **62** (7): 1104-1112.

Chen, S. M., Dumler, J. S., Bakken, J. S. and Walker, D. H. (1994). "Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease." Journal of Clinical Microbiology, **32** (3): 589-595.

Chmielewska-Badora, J., Zwolinski, J., Cisak, E., Wojcik-Fatla, A., Buczek, A. and Dutkiewicz, J. (2007). "Prevalence of Anaplasma phagocytophilum in Ixodes ricinus ticks determined by polymerase chain reaction with two pairs of primers detecting 16S rRNA and ankA genes." Annals of Agricultural and Environmental Medicine, **14** (2): 281-285.

Chomel, B. B., Boulouis, H. J., Maruyama, S. and Breitschwerdt, E. B. (2006). "Bartonella spp. in pets and effect on human health." Emerging Infectious Diseases, **12** (3): 389-394.

Christoph, H.-J. (1997). Klinik der Hundekrankheiten. Stuttgart, Enke Verlag. 1106.

Christova, I., Van De Pol, J., Yazar, S., Velo, E. and Schouls, L. (2003). "Identification of Borrelia burgdorferi sensu lato, Anaplasma and Ehrlichia species, and spotted fever group Rickettsiae in ticks from Southeastern Europe." European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, **22** (9): 535-542.

Christova, I., Velinov, T., Kantardjiev, T. and Galev, A. (2004). "Tularaemia outbreak in Bulgaria." Scandinavian Journal of Infectious Diseases, **36** (11-12): 785-789.

Cinco, M., Padovan, D., Murgia, R., Maroli, M., Frusteri, L., Heldtander, M., Johansson, K. E. and Engvall, E. O. (1997). "Coexistence of Ehrlichia phagocytophila and Borrelia burgdorferi sensu lato in Ixodes ricinus ticks from Italy as determined by 16S rRNA gene sequencing." Journal of Clinical Microbiology, **35** (12): 3365-3366.

Cochez, C., Lempereur, L., Madder, M., Claerebout, E., Simons, L., N, D. E. W., Linden, A., Saegerman, C., Heyman, P. and Losson, B. (2012). "Foci report on indigenous Dermacentor reticulatus populations in Belgium and a preliminary study of associated babesiosis pathogens." Medical and Veterinary Entomology, **26** (3): 355-358.

Cutler, S. J. (2010). "Relapsing fever--a forgotten disease revealed." Journal of Applied Microbiology, **108** (4): 1115-1122.

Daniel, M., Danielova, V., Kriz, B., Jirsa, A. and Nozicka, J. (2003). "Shift of the tick Ixodes ricinus and tick-borne encephalitis to higher altitudes in central Europe." European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology, **22** (5): 327-328.

Dantas-Torres, F., Figueredo, L. A. and Brandao-Filho, S. P. (2006). "Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, **39** (1): 64-67.

Dautel, H., Dippel, C., Oehme, R., Hartelt, K. and Schettler, E. (2006). "Evidence for an increased geographical distribution of *Dermacentor reticulatus* in Germany and detection of *Rickettsia* sp. RpA4." International Journal of Medical Microbiology, **296 Suppl 40**: 149-156.

de la Fuente, J., Atkinson, M. W., Naranjo, V., Fernandez de Mera, I. G., Mangold, A. J., Keating, K. A. and Kocan, K. M. (2007). "Sequence analysis of the msp4 gene of Anaplasma ovis strains." Veterinary Microbiology, **119** (2-4): 375-381.

de la Fuente, J., Torina, A., Caracappa, S., Tumino, G., Furla, R., Almazan, C. and Kocan, K. M. (2005). "Serologic and molecular characterization of Anaplasma species infection in farm animals and ticks from Sicily." Veterinary Parasitology, **133** (4): 357-362.

de la Fuente, J., Torina, A., Naranjo, V., Nicosia, S., Alongi, A., La Mantia, F. and Kocan, K. M. (2006). "Molecular characterization of Anaplasma platys strains from dogs in Sicily, Italy." BMC Veterinary Research, **2**: 24.

De Meeus, T., Lorimier, Y. and Renaud, F. (2004). "Lyme borreliosis agents and the genetics and sex of their vector, *Ixodes ricinus*." Microbes and Infection / Institut Pasteur, **6** (3): 299-304.

Demma, L. J., Traeger, M. S., Nicholson, W. L., Paddock, C. D., Blau, D. M., Eremeeva, M. E., Dasch, G. A., Levin, M. L., Singleton, J., Jr., Zaki, S. R., Cheek, J. E., Swerdlow, D. L. and McQuiston, J. H. (2005). "Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona." The New England Journal of Medicine, **353** (6): 587-594.

Deplazes, P., Eckert, J., von Samson-Himmelstjerna, G. and Zahner, H. (2013). Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Stuttgart, Enke Verlag. **3., überarbeitete Auflage**: S. 377-401. Kapitel 14.1.1.

des Vignes, F., Piesman, J., Heffernan, R., Schulze, T., Stafford, K., 3rd and Fish, D. (2001). "Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs." The Journal of Infectious Diseases, **183** (5): 773-778.

Di Cicco, M. F., Downey, M. E., Beeler, E., Marr, H., Cyrog, P., Kidd, L., Diniz, P. P., Cohn, L. A. and Birkenheuer, A. J. (2012). "Re-emergence of *Babesia conradae* and effective treatment of infected dogs with atovaquone and azithromycin." Veterinary Parasitology, **187** (1-2): 23-27.

Diniz, P. P., Schulz, B. S., Hartmann, K. and Breitschwerdt, E. B. (2011). "'Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*' infection in a dog from Germany." Journal of Clinical Microbiology, **49** (5): 2059-2062.

Dobec, M., Golubic, D., Punda-Polic, V., Kaeppli, F. and Sievers, M. (2009). "*Rickettsia helvetica* in *Dermacentor reticulatus* ticks." Emerging Infectious Diseases, **15** (1): 98-100.

Dobler, G., Essbauer, S. and Wölfel, R. (2009). "Isolation and preliminary characterisation of '*Rickettsia monacensis*' in south-eastern Germany." Clinical Microbiology and Infection, **15 Suppl 2**: 263-264.

Dobler, G. and Wölfel, R. (2009). "Fleckfieber und andere Rickettsiosen." Deutsches Ärzteblatt International **106** (20): 348-354.

Duh, D., Petrovec, M. and Avsic-Zupanc, T. (2001). "Diversity of *Babesia* infecting European sheep ticks (*Ixodes ricinus*)." Journal of Clinical Microbiology, **39** (9): 3395-3397.

Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rikihisa, Y. and 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." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **51** (Pt 6): 2145-2165.

Duncan, A. W., Correa, M. T., Levine, J. F. and Breitschwerdt, E. B. (2005). "The dog as a sentinel for human infection: prevalence of Borrelia burgdorferi C6 antibodies in dogs from southeastern and mid-Atlantic States." Vector Borne and Zoonotic Diseases, **5** (2): 101-109.

Dürbaum, M., Dauschies, A. and Leopold-Temmler, B. (2000). "Die Babesiose des Hundes durch *Babesia canis* (Piana und Galli-Valerio 1895)." Der Praktische Tierarzt, **82** (9): 699-710.

Dusbabek, F. (1996). "Nymphal sexual dimorphism in the sheep tick Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae)." Folia Parasitologica, **43** (1): 75-79.

Dyachenko, V., Pantchev, N., Balzer, H. J., Meyersen, A. and Straubinger, R. K. (2012). "First case of Anaplasma platys infection in a dog from Croatia." Parasites & Vectors, **5**: 49.

Egenvall, A. E., Hedhammar, A. A. and Bjoersdorff, A. I. (1997). "Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden." The Veterinary Record, **140** (9): 222-226.

Elchos, B. N. and Goddard, J. (2003). "Implications of presumptive fatal Rocky Mountain spotted fever in two dogs and their owner." Journal of the American Veterinary Medical Association, **223** (10): 1450-1452, 1433.

Englund, L. and Pringle, J. (2003). "New diseases and increased risk of diseases in companion animals and horses due to transport." Acta Veterinaria Scandinavica. Supplementum, **100**: 19-25.

Estrada-Pena, A. and Ascher, F. (1999). "Comparison of an amitraz-impregnated collar with topical administration of fipronil for prevention of experimental and natural infestations by the brown dog tick (Rhipicephalus sanguineus)." Journal of the American Veterinary Medical Association, **214** (12): 1799-1803.

Estrada-Pena, A. and Jongejan, F. (1999). "Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission." Experimental & Applied Acarology, **23** (9): 685-715.

Falco, R. C., Fish, D. and Piesman, J. (1996). "Duration of tick bites in a Lyme disease-endemic area." American Journal of Epidemiology, **143** (2): 187-192.

Falco, R. C., Smith, H. A., Fish, D., Mojica, B. A., Bellinger, M. A., Harris, H. L. and Hechemy, K. E. (1993). "The distribution of canine exposure to *Borrelia burgdorferi* in a Lyme-Disease endemic area." American Journal of Public Health, **83** (9): 1305-1310.

Fay, M. P. and Feuer, E. J. (1997). "Confidence intervals for directly standardized rates: a method based on the gamma distribution." Statistics in Medicine, **16** (7): 791-801.

Fehr, J. S., Bloemberg, G. V., Ritter, C., Hombach, M., Luscher, T. F., Weber, R. and Keller, P. M. (2010). "Septicemia caused by tick-borne bacterial pathogen *Candidatus Neohrlichia mikurensis*." Emerging Infectious Diseases, **16** (7): 1127-1129.

Fernandez-Soto, P., Perez-Sanchez, R., Encinas-Grandes, A. and Sanz, R. A. (2004). "Detection and identification of *Rickettsia helvetica* and *Rickettsia* sp. IRS3/IRS4 in *Ixodes ricinus* ticks found on humans in Spain." European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, **23** (8): 648-649.

Fertner, M., Molbak, L., Boye Pihl, T., Fomsgaard, A. and Bodker, R. (2012). "First detection of tick-borne *Candidatus Neohrlichia mikurensis* in Denmark 2011." Euro surveillance: Bulletin Europeen sur les Maladies Transmissibles **17** (8): 1-3.

Fingerle, V., Goodman, J. L., Johnson, R. C., Kurtti, T. J., Munderloh, U. G. and Wilske, B. (1997). "Human granulocytic ehrlichiosis in southern Germany: increased seroprevalence in high-risk groups." Journal of Clinical Microbiology, **35** (12): 3244-3247.

Fingerle, V., Goodman, J. L., Johnson, R. C., Kurtti, T. J., Munderloh, U. G. and Wilske, B. (1999). "Epidemiological aspects of human granulocytic Ehrlichiosis in southern Germany." Wiener klinische Wochenschrift, **111** (22/23): 1000-1004.

Foggie, A. (1951). "Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep." The Journal of Pathology and Bacteriology, **63** (1): 1-15.

Foldvari, G., Hell, E. and Farkas, R. (2005). "Babesia canis canis in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing." Veterinary Parasitology, **127** (3-4): 221-226.

Fraenkel, C. J., Garpmo, U. and Berglund, J. (2002). "Determination of novel Borrelia genospecies in Swedish Ixodes ricinus ticks." Journal of Clinical Microbiology, **40** (9): 3308-3312.

French, T. W. and Harvey, J. W. (1983). "Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test." American Journal of Veterinary Research, **44** (12): 2407-2411.

Frey, H.-H. and Löscher, W. (2009). Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. 3, Enke Verlag. 508-509.

Furlanello, T., Fiorio, F., Caldin, M., Lubas, G. and Solano-Gallego, L. (2005). "Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form Babesia from dogs of northeastern Italy." Veterinary Parasitology, **134** (1-2): 77-85.

Galke, D. (2010). "Infektion mit Anaplasma phagozytophilum beim Hund - eine Studie über Prävalenz, Prävention, Klinik". Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere des Fachbereichs Veterinärmedizin. Berlin, Freie Universität. Dissertation.

Gargili, A., Palomar, A. M., Midilli, K., Portillo, A., Kar, S. and Oteo, J. A. (2012). "Rickettsia Species in Ticks Removed from Humans in Istanbul, Turkey." Vector Borne and Zoonotic Diseases.

Gern, L. (2005). "The biology of the Ixodes ricinus tick." Therapeutische Umschau, **62** (11): 707-712.

Gern, L., Toutoungi, L. N., Hu, C. M. and Aeschlimann, A. (1991). "Ixodes (Pholeoixodes) hexagonus, an efficient vector of Borrelia burgdorferi in the laboratory." Medical and Veterinary Entomology, **5** (4): 431-435.

Goossens, H. A., van den Bogaard, A. E. and Nohlmans, M. K. (2001). "Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in The Netherlands." Journal of Clinical Microbiology, **39** (3): 844-848.

Gorenflot, A., Moubri, K., Precigout, E., Carcy, B. and Schetters, T. P. (1998). "Human babesiosis." Annals of Tropical Medicine and Parasitology, **92** (4): 489-501.

Gray, J., Dautel, H., Estrada-Pena, A., Kahl, O. and Lindgren, E. (2009). "Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe." Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, **2009** (Article ID 593232): 1-12.

Gray, J., Stanek, G., Kundi, M. and Kocianova, E. (2005). "Dimensions of engorging *Ixodes ricinus* as a measure of feeding duration." International Journal of Medical Microbiology, **295** (8): 567-572.

Gray, J., von Stedingk, L. V., Gurtelschmid, M. and Granstrom, M. (2002). "Transmission studies of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks and gerbils." Journal of Clinical Microbiology, **40** (4): 1259-1263.

Grzeszczuk, A. and Stanczak, J. (2006). "Highly variable year-to-year prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in northeastern Poland: a 4-year follow-up." Annals of the New York Academy of Sciences, **1078**: 309-311.

Guindon, S. and Gascuel, O. (2003). "A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood." Systematic Biology, **52** (5): 696-704.

Haglund, M. and Gunther, G. (2003). "Tick-borne encephalitis--pathogenesis, clinical course and long-term follow-up." Vaccine, **21 Suppl 1**: S11-18.

Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucleic Acids Symposium Series, **41**: 95-98.

Halos, L., Bord, S., Cotte, V., Gasqui, P., Abrial, D., Barnouin, J., Boulouis, H. J., Vayssier-Taussat, M. and Vourc'h, G. (2010). "Ecological factors characterizing the prevalence of bacterial tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in pastures and woodlands." Applied Environmental Microbiology, **76** (13): 4413-4420.

Halos, L., Vourc'h, G., Cotte, V., Gasqui, P., Barnouin, J., Boulouis, H. J. and Vayssier-Taussat, M. (2006). "Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* sp. and *Borrelia burgdorferi sensu lato* DNA in questing *Ixodes ricinus* ticks from France." Annals of the New York Academy of Sciences, **1078**: 316-319.

Hamel, D., Rohrig, E. and Pfister, K. (2011). "Canine vector-borne disease in travelled dogs in Germany--a retrospective evaluation of laboratory data from the years 2004-2008." Veterinary Parasitology, **181** (1): 31-36.

Harrus, S., Aroch, I., Lavy, E. and Bark, H. (1997). "Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia." The Veterinary Record, **141** (10): 247-250.

Hartelt, K., Oehme, R., Frank, H., Brockmann, S. O., Hassler, D. and Kimmig, P. (2004). "Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany." International Journal of Medical Microbiology, **293 Suppl 37**: 86-92.

Hartelt, K., Pluta, S., Oehme, R. and Kimmig, P. (2008). "Spread of ticks and tick-borne diseases in Germany due to global warming." Parasitology Research, **103 Suppl 1**: S109-116.

Hartelt, K., Rieker, T., Oehme, R. M., Brockmann, S. O., Müller, W. and Dorn, N. (2007). "First evidence of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) in dogs in Western Europe." Vector Borne and Zoonotic Diseases, **7** (2): 163-166.

Hasle, G., Leinaas, H. P., Roed, K. H. and Oines, O. (2011). "Transport of *Babesia venatorum*-infected *Ixodes ricinus* to Norway by northward migrating passerine birds." Acta Veterinaria Scandinavica, **53** (41): 1-5.

Hayes, S. F., Burgdorfer, W. and Aeschlimann, A. (1980). "Sexual transmission of spotted fever group rickettsiae by infected male ticks: detection of rickettsiae in immature spermatozoa of *Ixodes ricinus*." Infection and Immunity, **27** (2): 638-642.

Heile, C., Heydorn, A. O. and Schein, E. (2006). "Dermacentor reticulatus (Fabricius, 1794)--distribution, biology and vector for *Babesia canis* in Germany." Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, **119** (7-8): 330-334.

Heile, C., Hoffman-Köhler, P., Wieman, A. and Schein, E. (2007). "Übertragungszeiten von durch Zecken übertragenen Erregern beim Hund: Borrelien, Anaplasmen/Ehrlichien und Babesien." Praktischer Tierarzt, **88** (8): 584-590.

Herwaldt, B. L., Caccio, S., Gherlinzoni, F., Aspöck, H., Slemenda, S. B., Piccaluga, P., Martinelli, G., Edelhofer, R., Hollenstein, U., Poletti, G., Pampiglione, S., Loschenberger, K., Tura, S. and Pieniasek, N. J. (2003). "Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe." Emerging Infectious Diseases, **9** (8): 942-948.

Hildebrandt, A., Hunfeld, K. P., Baier, M., Krumbholz, A., Sachse, S., Lorenzen, T., Kiehntopf, M., Fricke, H. J. and Straube, E. (2007). "First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe." European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases **26** (8): 595-601.

Hildebrandt, A., Kramer, A., Sachse, S. and Straube, E. (2010). "Detection of *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia)." Ticks and Tick-Borne Diseases, **1** (1): 52-56.

Hildebrandt, A., Schmidt, K. H., Fingerle, V., Wilske, B. and Straube, E. (2002). "Prevalence of granulocytic Ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany (Thuringia) detected by PCR and sequencing of a 16S ribosomal DNA fragment." FEMS Microbiology Letters, **211** (2): 225-230.

Hillyard, P. D. (1996). Ticks of North-Western Europe: Synopses of the British Fauna (New Series). Shrewsbury, Field Studies Council. 1-178.

Hoby, S., Mathis, A., Doherr, M. G., Robert, N. and Ryser-Degiorgis, M. P. (2009). "Babesia capreoli infections in alpine chamois (*Rupicapra r. Rupicapra*), roe deer (*Capreolus c. Capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) from Switzerland." Journal of Wildlife Diseases, **45** (3): 748-753.

Hodzic, E., Fish, D., Maretzki, C. M., De Silva, A. M., Feng, S. and Barthold, S. W. (1998). "Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks." Journal of Clinical Microbiology, **36** (12): 3574-3578.

Hollis, D. G., Weaver, R. E., Steigerwalt, A. G., Wenger, J. D., Moss, C. W. and Brenner, D. J. (1989). "Francisella philomiragia comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and Francisella tularensis biogroup novicida (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease." Journal of Clinical Microbiology, **27** (7): 1601-1608.

Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., 3rd, Krause, P. J. and Persing, D. H. (2000). "Babesiosis." Clinical Microbiology Reviews, **13** (3): 451-469.

Hornok, S., Elek, V., de la Fuente, J., Naranjo, V., Farkas, R., Majoros, G. and Foldvari, G. (2007). "First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary." Veterinary Microbiology, **122** (3-4): 316-322.

Hovius, J. W., Hovius, K. E., Oei, A., Houwers, D. J. and van Dam, A. P. (2000). "Antibodies against specific proteins of and immobilizing activity against three strains of *Borrelia burgdorferi sensu lato* can be found in symptomatic but not in infected asymptomatic dogs." Journal of Clinical Microbiology, **38** (7): 2611-2621.

Hovius, K. E., Stark, L. A., Bleumink-Pluym, N. M., van de Pol, I., Verbeek-de Kruijff, N., Rijpkema, S. G., Schouls, L. M. and Houwers, D. J. (1999). "Presence and distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in internal organs and skin of naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs, as detected by polymerase chain reaction." The Veterinary Quarterly, **21** (2): 54-58.

Innis, M. A., Myambo, K. B., Gelfand, D. H. and Brow, M. A. (1988). "DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **85** (24): 9436-9440.

Inokuma, H., Maetani, S., Fujitsuka, J., Takano, A., Sato, K., Fukui, T., Masuzawa, T. and Kawabata, H. (2013). "Astasia and Pyrexia Related to *Borrelia garinii* Infection in Two Dogs in Hokkaido, Japan." The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science.

Inokuma, H., Yoshizaki, Y., Matsumoto, K., Okuda, M., Onishi, T., Nakagome, K., Kosugi, R. and Hirakawa, M. (2004). "Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan." Veterinary Parasitology, **121** (3-4): 341-346.

Irwin, P. J. (2009). "Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control." Parasites & Vectors, **2 Suppl 1**: 1-9.

Irwin, P. J. and Hutchinson, G. W. (1991). "Clinical and pathological findings of *Babesia* infection in dogs." Australian Veterinary Journal, **68** (6): 204-209.

Jahfari, S., Fonville, M., Hengeveld, P., Reusken, C., Scholte, E. J., Takken, W., Heyman, P., Medlock, J., Heylen, D., Kleve, J. and Sprong, H. (2012). "Prevalence of *Neoehrlichia mikurensis* in ticks and rodents from North-west Europe." Parasites & Vectors, **5** (1): 1-10.

Juncadella, I. J. and Anguita, J. (2009). "The immunosuppressive tick salivary protein, Salp15." Advances in Experimental Medicine and Biology, **666**: 121-131.

Kahl, O., Janetzki-Mittmann, C., Gray, J. S., Jonas, R., Stein, J. and 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." Zentralblatt für Bakteriologie, **287** (1/2): 41-52.

Kane, A., Block, G. and Heeb, L. A. (2011). "An unusual presentation of granulocytic anaplasmosis in a young dog." Journal of the American Animal Hospital Association, **47** (4): 276-279.

Karbowiak, G. (2004). "Zoonotic reservoir of *Babesia microti* in Poland." Polish Journal of Microbiology, **53 Suppl**: 61-65.

Katavolos, P., Armstrong, P. M., Dawson, J. E. and Telford, S. R., 3rd (1998). "Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis." The Journal of Infectious Diseases, **177** (5): 1422-1425.

Kawahara, M., Rikihisa, Y., Isogai, E., Takahashi, M., Misumi, H., Suto, C., Shibata, S., Zhang, C. and 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." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **54** (Pt 5): 1837-1843.

Kawahara, M., Rikihisa, Y., Lin, Q., Isogai, E., Tahara, K., Itagaki, A., Hiramitsu, Y. and Tajima, T. (2006). "Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major islands in Japan." Applied and Environmental Microbiology, **72** (2): 1102-1109.

Keenan, K. P., Buhles, W. C., Jr., Huxsoll, D. L., Williams, R. G., Hildebrandt, P. K., Campbell, J. M. and Stephenson, E. H. (1977). "Pathogenesis of infection with *Rickettsia rickettsii* in the dog: a disease model for Rocky Mountain spotted fever." The Journal of Infectious Diseases, **135** (6): 911-917.

Kiehl, W. and Fehrmann, S. (2001). Epidemiologisches Bulletin. Robert-Koch-Institut. Berlin. **8**: 55-62

Kjemtrup, A. M. and Conrad, P. A. (2000). "Human babesiosis: an emerging tick-borne disease." International Journal for Parasitology, **30** (12-13): 1323-1337.

Kohn, B., Galke, D., Beelitz, P. and Pfister, K. (2008). "Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs." Journal of Veterinary Internal Medicine **22** (6): 1289-1295.

Kohn, B., Silaghi, C., Galke, D., Arndt, G. and Pfister, K. (2011). "Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany." Research in Veterinary Science, **91** (1): 71-76.

Kontos, V. I., Papadopoulos, O. and French, T. W. (1991). "Natural and experimental canine infections with a Greek strain of *Ehrlichia platys*." Veterinary Clinical Pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology, **20** (4): 101-105.

Kowalski, J., Hopfenmüller, W., Fingerle, V., Malberg, H., Eisenblätter, M., Wagner, J., Miksits, K., Hahn, H. and Ignatius, R. (2006). "Seroprevalence of human granulocytic anaplasmosis in Berlin/Brandenburg, Germany: an 8-year survey." Clinical Microbiology and Infection **12** (9): 924-927.

Krupka, I., Pantchev, N., Lorentzen, L., Weise, M. and Straubinger, R. (2007). "Durch Zecken übertragbare bakterielle Infektionen bei Hunden: Seroprävalenzen von *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* und *Ehrlichia canis* in Deutschland." Praktischer Tierarzt, **88** (10): 776–788.

Labruna, M. B., Pacheco, R. C., Nava, S., Brandao, P. E., Richtzenhain, L. J. and Guglielmo, A. A. (2007). "Infection by *Rickettsia bellii* and *Candidatus "Rickettsia amblyommii"* in *Amblyomma neumanni* ticks from Argentina." Microbial Ecology, **54** (1): 126-133.

Labuda, M., Kozuch, O., Zuffova, E., Eleckova, E., Hails, R. S. and Nuttall, P. A. (1997). "Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts." Virology, **235** (1): 138-143.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." Bioinformatics, **23** (21): 2947-2948.

Lebech, A. M., Hansen, K., Wilske, B. and Theisen, M. (1994). "Taxonomic classification of 29 *Borrelia burgdorferi* strains isolated from patients with Lyme borreliosis: a comparison of five different phenotypic and genotypic typing schemes." Medical Microbiology and Immunology, **183** (6): 325-341.

Lehtinen, L. E., Birkenheuer, A. J., Droleskey, R. E. and Holman, P. J. (2008). "In vitro cultivation of a newly recognized *Babesia* sp. in dogs in North Carolina." Veterinary Parasitology, **151** (2-4): 150-157.

Leonhard, S. (2005). "Untersuchungen zur Häufigkeit von *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum* und *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* aus Bayern und Baden-Württemberg". Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät. München, Ludwig-Maximilians-Universität. Dissertation.

Leschnik, M. W., Kirtz, G. C. and Thalhammer, J. G. (2002). "Tick-borne encephalitis (TBE) in dogs." International Journal of Medical Microbiology, **291 Suppl 33**: 66-69.

Levy, C. e. a. (2004). "Fatal cases of Rocky Mountain spotted fever in family clusters-three states, 2003." Morbidity and Mortality Weekly Report, **53** (19): 407-410.

Lewis, D. and Young, E. R. (1980). "The transmission of a human strain of *Babesia divergens* by *Ixodes ricinus* ticks." The Journal of Parasitology, **66** (2): 359-360.

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. and Cao, W. C. (2012). "Human Infection with *Candidatus Neohhrlichia mikurensis*, China." Emerging Infectious Diseases, **18** (10): 1636-1639.

Liebisch, A. and Walter, G. (1986). "Untersuchungen von Zecken bei Haus- und Wildtieren in Deutschland: Zum Vorkommen und zur Biologie der Igelzecke (*Ixodes hexagonus*) und der Fuchszecke (*Ixodes canisuga*)." Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, **93**: 447-450.

Lindenmayer, J. M., Marshall, D. and Onderdonk, A. B. (1991). "Dogs as sentinels for Lyme disease in Massachusetts." American Journal of Public Health, **81** (11): 1448-1455.

Littman, M. P., Goldstein, R. E., Labato, M. A., Lappin, M. R. and Moore, G. E. (2006). "ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention." Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine, **20** (2): 422-434.

Löscher, W., Ungemach, F. R. and Kroker, K. (2006). Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. Stuttgart, Parey. 312-331.

Madewell, B. R. and Gribble, D. H. (1982). "Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*." Journal of the American Veterinary Medical Association, **180** (5): 512-514.

Madigan, J. E. and Gribble, D. (1987). "Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968-1981)." Journal of the American Veterinary Medical Association, **190** (4): 445-448.

Magnarelli, L. A., Anderson, J. F., Kaufmann, A. F., Lieberman, L. L. and Whitney, G. D. (1985). "Borreliosis in dogs from southern Connecticut." Journal of the American Veterinary Medical Association, **186** (9): 955-959.

Manna, L., Alberti, A., Pavone, L. M., Scibelli, A., Staiano, N. and Gravino, A. E. (2004). "First molecular characterization of a granulocytic *Ehrlichia* strain isolated from a dog in South Italy." Veterinary Journal, **167** (3): 224-227.

Marconi, R. T., Hohenberger, S., Jauris-Heipke, S., Schulte-Spechtel, U., LaVoie, C. P., Rossler, D. and Wilske, B. (1999). "Genetic analysis of *Borrelia garinii* OspA

serotype 4 strains associated with neuroborreliosis: evidence for extensive genetic homogeneity." Journal of Clinical Microbiology, **37** (12): 3965-3970.

Marquez, F. J. (2008). "Spotted fever group Rickettsia in ticks from southeastern Spain natural parks." Experimental & Applied Acarology, **45** (3-4): 185-194.

Martinod, S., Laurent, N. and Moreau, Y. (1986). "Resistance and immunity of dogs against *Babesia canis* in an endemic area." Veterinary Parasitology, **19** (3-4): 245-254.

Massung, R. F., Slater, K., Owens, J. H., Nicholson, W. L., Mather, T. N., Solberg, V. B. and Olson, J. G. (1998). "Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae." Journal of Clinical Microbiology, **36** (4): 1090-1095.

Matjila, P. T., Penzhorn, B. L., Bekker, C. P., Nijhof, A. M. and Jongejan, F. (2004). "Confirmation of occurrence of *Babesia canis vogeli* in domestic dogs in South Africa." Veterinary Parasitology, **122** (2): 119-125.

Matjila, T. P., Nijhof, A. M., Taoufik, A., Houwers, D., Teske, E., Penzhorn, B. L., de Lange, T. and Jongejan, F. (2005). "Autochthonous canine babesiosis in The Netherlands." Veterinary Parasitology, **131** (1-2): 23-29.

Matuschka, F. R., Richter, D., Fischer, P. and Spielman, A. (1990). "Nocturnal detachment of the tick *Ixodes hexagonus* from nocturnally active hosts." Medical and Veterinary Entomology, **4** (4): 415-420.

Maurin, M. and Raoult, D. (1999). "Q fever." Clinical Microbiology Reviews, **12** (4): 518-553.

Mazepa, A. W., Kidd, L. B., Young, K. M. and Trepanier, L. A. (2010). "Clinical presentation of 26 anaplasma phagocytophilum-seropositive dogs residing in an endemic area." Journal of the American Animal Hospital Association, **46** (6): 405-412.

Medlock, J. M., Hansford, K. M., Bormane, A., Derdakova, M., Estrada-Pena, A., George, J. C., Golovljova, I., Jaenson, T. G., Jensen, J. K., Jensen, P. M., Kazimirova, M., Oteo, J. A., Papa, A., Pfister, K., Plantard, O., Randolph, S. E., Rizzoli, A., Santos-Silva, M. M., Sprong, H., Vial, L., Hendrickx, G., Zeller, H. and Van Bortel, W. (2013). "Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe." Parasites & Vectors, **6** (1): 1.

Mehlhorn, H. and Schein, E. (1984). "The piroplasms: life cycle and sexual stages." Advances in Parasitology, **23**: 37-103.

Mehlhorn, H. and Schein, E. (1998). "Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998." Parasitology Research, **84** (6): 467-475.

Meiners, T., Hammer, B., Gobel, U. B. and Kahl, O. (2006). "Determining the tick scutal index allows assessment of tick feeding duration and estimation of infection risk with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in a person bitten by an *Ixodes ricinus* nymph." International Journal of Medical Microbiology, **296 Suppl 40**: 103-107.

Morrison, W. I. and McKeever, D. J. (2006). "Current status of vaccine development against *Theileria* parasites." Parasitology, **133 Suppl**: S169-187.

Movila, A., Rolain, J. M., Podavalenko, A., Toderas, I., Tkachenco, L., Naglov, V. and Raoult, D. (2009). "Detection of spotted fever group rickettsiae and family Anaplasmataceae in *Ixodes ricinus* ticks from Republic of Moldova and Eastern Ukraine." Clinical Microbiology and Infection, **15 Suppl 2**: 32-33.

Mühlhardt, C. (2009). Der Experimentator - Molekularbiologie/Genomics. 6. Auflage, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. 42-119.

Mulisch, M. and Welsch, U. (2010). Mikroskopische Technik. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag. 347-556.

Murray, R. G. and Stackebrandt, E. (1995). "Taxonomic note: implementation of the provisional status Candidatus for incompletely described procaryotes." International Journal of Systematic Bacteriology, **45** (1): 186-187.

Mylonakis, M. E., Kritsepi-Konstantinou, M., Dumler, J. S., Diniz, P. P., Day, M. J., Siarkou, V. I., Breitschwerdt, E. B., Psychas, V., Petanides, T. and Koutinas, A. F. (2010). "Severe hepatitis associated with acute *Ehrlichia canis* infection in a dog." Journal of Veterinary Internal Medicine, **24** (3): 633-638.

Nakajima, R., Tsuji, M., Oda, K., Zamoto-Niikura, A., Wei, Q., Kawabuchi-Kurata, T., Nishida, A. and Ishihara, C. (2009). "Babesia microti-group parasites compared phylogenetically by complete sequencing of the CCTeta gene in 36 isolates." The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science, **71** (1): 55-68.

Nakao, M. and Sato, Y. (1996). "Refeeding activity of immature ticks of *Ixodes persulcatus* and transmission of Lyme disease spirochete by partially fed larvae." The Journal of Parasitology, **82** (4): 669-672.

Naucke, J. T. (2008). "Babesiose/Piroplasmose - ein Update." Veterinär Spiegel, (1): 14-18.

Nicholson, W. L., Allen, K. E., McQuiston, J. H., Breitschwerdt, E. B. and Little, S. E. (2010). "The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people." Trends in Parasitology, **26** (4): 205-212.

Nijhof, A. M., Bodaan, C., Postigo, M., Nieuwenhuijs, H., Opsteegh, M., Franssen, L., Jebbink, F. and Jongejan, F. (2007). "Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands." Vector Borne and Zoonotic Diseases, **7** (4): 585-595.

Nilsson, K., Elfving, K. and Pahlson, C. (2010). "Rickettsia helvetica in patient with meningitis, Sweden, 2006." Emerging Infectious Diseases, **16** (3): 490-492.

Nilsson, K., Lindquist, O., Liu, A. J., Jaenson, T. G., Friman, G. and Pahlson, C. (1999). "Rickettsia helvetica in Ixodes ricinus ticks in Sweden." Journal of Clinical Microbiology, **37** (2): 400-403.

Ogden, N. H., Cripps, P., Davison, C. C., Owen, G., Parry, J. M., Timms, B. J. and Forbes, A. B. (2000). "The ixodid tick species attaching to domestic dogs and cats in Great Britain and Ireland." Medical and Veterinary Entomology, **14** (3): 332-338.

Oines, O., Radzijeuskaja, J., Paulauskas, A. and Rosef, O. (2012). "Prevalence and diversity of Babesia spp. in questing Ixodes ricinus ticks from Norway." Parasites & Vectors, **5** (1): 1-8.

Oines, O., Storli, K. and Brun-Hansen, H. (2010). "First case of babesiosis caused by Babesia canis canis in a dog from Norway." Veterinary Parasitology, **171** (3-4): 350-353.

Olson, P. E., Kallen, A. J., Bjerneby, J. M. and Creek, J. G. (2000). "Canines as sentinels for Lyme disease in San Diego County, California." Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, **12** (2): 126-129.

Ooshiro, M., Zakimi, S., Matsukawa, Y., Katagiri, Y. and Inokuma, H. (2008). "Detection of Anaplasma bovis and Anaplasma phagocytophilum from cattle on Yonaguni Island, Okinawa, Japan." Veterinary Parasitology, **154** (3-4): 360-364.

Openshaw, J. J., Swerdlow, D. L., Krebs, J. W., Holman, R. C., Mandel, E., Harvey, A., Haberling, D., Massung, R. F. and McQuiston, J. H. (2010). "Rocky Mountain spotted fever in the United States, 2000-2007: Interpreting contemporary increases in incidence." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, **83** (1): 174-182.

Parola, P. and Raoult, D. (2001). "Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat." Clinical Infectious Diseases, **32** (6): 897-928.

Parola, P., Rovero, C., Rolain, J. M., Brouqui, P., Davoust, B. and Raoult, D. (2009). "Rickettsia slovaca and R. raoultii in tick-borne Rickettsioses." Emerging Infectious Diseases, **15** (7): 1105-1108.

Passos, L. M., Geiger, S. M., Ribeiro, M. F., Pfister, K. and Zahler-Rinder, M. (2005). "First molecular detection of Babesia vogeli in dogs from Brazil." Veterinary Parasitology, **127** (1): 81-85.

Pekova, S., Vydra, J., Kabickova, H., Frankova, S., Haugvicova, R., Mazal, O., Cmejla, R., Hardekopf, D. W., Jancuskova, T. and Kozak, T. (2011). "Candidatus Neoehrlichia mikurensis infection identified in 2 hematooncologic patients: benefit of molecular techniques for rare pathogen detection." Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, **69** (3): 266-270.

Perez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q. and Rikihisa, Y. (2006). "Human infection with Ehrlichia canis accompanied by clinical signs in Venezuela." Annals of the New York Academy of Sciences, **1078**: 110-117.

Philip, C. B. (1959). "Some epidemiological considerations in Rocky Mountain spotted fever." Public Health Reports, **74** (7): 595-600.

Pichon, B., Kahl, O., Hammer, B. and Gray, J. S. (2006). "Pathogens and host DNA in Ixodes ricinus nymphal ticks from a German forest." Vector Borne Zoonotic Diseases, **6** (4): 382-387.

Platonov, A. E., Karan, L. S., Kolyasnikova, N. M., Makhneva, N. A., Toporkova, M. G., Maleev, V. V., Fish, D. and Krause, P. J. (2011). "Humans infected with relapsing fever spirochete Borrelia miyamotoi, Russia." Emerging Infectious Diseases, **17** (10): 1816-1823.

Pluta, S., Hartelt, K., Oehme, R., Mackenstedt, U. and Kimmig, P. (2010). "Prevalence of Coxiella burnetii and Rickettsia spp. in ticks and rodents in southern Germany." Ticks and Tick Borne Diseases, **1** (3): 145-147.

Poitout, F. M., Shinozaki, J. K., Stockwell, P. J., Holland, C. J. and Shukla, S. K. (2005). "Genetic variants of Anaplasma phagocytophilum infecting dogs in Western Washington State." Journal of Clinical Microbiology, **43** (2): 796-801.

Portillo, A., Perez-Martinez, L., Santibanez, S., Santibanez, P., Palomar, A. M. and Oteo, J. A. (2011). "Anaplasma spp. in wild mammals and Ixodes ricinus from the north of Spain." Vector Borne and Zoonotic Diseases, **11** (1): 3-8.

Portnoi, D., Sertour, N., Ferquel, E., Garnier, M., Baranton, G. and 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 Microbiology Letters, **259** (1): 35-40.

Posada, D. (2008). "jModelTest: phylogenetic model averaging." Molecular Biology and Evolution, **25** (7): 1253-1256.

Postic, D., Assous, M., Grimont, P. and Baranton, G. (1994). "Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons." Int J Syst Bacteriol, **44** (4): 743-752.

Price, W. H. (1954). "The epidemiology of Rocky Mountain spotted fever. II. Studies on the biological survival mechanism of *Rickettsia rickettsii*." American Journal of Hygiene, **60** (3): 292-319.

Pusterla, N., Huder, J., Wolfensberger, C., Litschi, B., Parvis, A. and Lutz, H. (1997). "Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland." Journal of Clinical Microbiology, **35** (9): 2307-2309.

Raghavan, M., Glickman, N., Moore, G., Caldanaro, R., Lewis, H. and Glickman, L. (2007). "Prevalence of and risk factors for canine tick infestation in the United States, 2002-2004." Vector Borne and Zoonotic Diseases, **7** (1): 65-75.

Rand, P. W., Lacombe, E. H., Elias, S. P., Cahill, B. K., Lubelczyk, C. B. and Smith, R. P., Jr. (2011). "Multitarget test for emerging Lyme disease and anaplasmosis in a serosurvey of dogs, Maine, USA." Emerging Infectious Diseases, **17** (5): 899-902.

Randolph, S. E. (1998). "Ticks are not Insects: Consequences of Contrasting Vector Biology for Transmission Potential." Parasitology Today, **14** (5): 186-192.

Raoult, D., Lakos, A., Fenollar, F., Beytout, J., Brouqui, P. and Fournier, P. E. (2002). "Spotless rickettsiosis caused by *Rickettsia slovaca* and associated with *Dermacentor* ticks." Clinical Infectious Diseases, **34** (10): 1331-1336.

Raoult, D. and Roux, V. (1997). "Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases." Clinical Microbiology Reviews, **10** (4): 694-719.

Rar, V. and Golovljova, I. (2011). "Anaplasma, Ehrlichia, and "Candidatus Neoehrlichia" bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review." Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in infectious Diseases, **11** (8): 1842-1861.

Rar, V. A., Livanova, N. N., Panov, V. V., Doroschenko, E. K., Pukhovskaya, N. M., Vysochina, N. P. and Ivanov, L. I. (2010). "Genetic diversity of Anaplasma and Ehrlichia in the Asian part of Russia." Ticks and Tick-borne Diseases, **1** (1): 57-65.

Rauter, C. and Hartung, T. (2005). "Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis." Applied and environmental microbiology, **71** (11): 7203-7216.

Rebaudet, S. and Parola, P. (2006). "Epidemiology of relapsing fever borreliosis in Europe." FEMS Immunology and Medical Microbiology, **48** (1): 11-15.

Regnery, R. and Tappero, J. (1995). "Unraveling mysteries associated with cat-scratch disease, bacillary angiomatosis, and related syndromes." Emerging Infectious Diseases, **1** (1): 16-21.

Reye, A. L., Hubschen, J. M., Sausy, A. and Muller, C. P. (2010). "Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg." Applied and Environmental Microbiology, **76** (9): 2923-2931.

Reyers, F., Leisewitz, A. L., Lobetti, R. G., Milner, R. J., Jacobson, L. S. and van Zyl, M. (1998). "Canine babesiosis in South Africa: more than one disease. Does this serve as a model for falciparum malaria?" Annals of Tropical Medicine and Parasitology, **92** (4): 503-511.

Richter, D., Debski, A., Hubalek, Z. and Matuschka, F. R. (2012). "Absence of Lyme disease spirochetes in larval *Ixodes ricinus* ticks." Vector Borne and Zoonotic Diseases, **12** (1): 21-27.

Richter, D., Kohn, C. and Matuschka, F. R. (2012). "Absence of *Borrelia* spp., *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in questing adult *Dermacentor reticulatus* ticks." Parasitology Research: 107-111.

Richter, D., Kohn, C. and Matuschka, F. R. (2013). "Absence of *Borrelia* spp., *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in questing adult *Dermacentor reticulatus* ticks." Parasitology Research, **112** (1): 107-111.

Richter, D. and Matuschka, F. R. (2012). "'*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*", *Anaplasma phagocytophilum* and Lyme disease spirochetes in questing European

vector ticks and in feeding ticks removed from people." Journal of Clinical Microbiology.

Richter, D., Schlee, D. B. and Matuschka, F. R. (2003). "Relapsing fever-like spirochetes infecting European vector tick of Lyme disease agent." Emerging Infectious Diseases, **9** (6): 697-701.

Richter, D., Schroder, B., Hartmann, N. K. and Matuschka, F. R. (2012). "Spatial stratification of various Lyme disease spirochetes in a Central European site." FEMS Microbiology Ecology.

Richter, J., Fournier, P. E., Petridou, J., Haussinger, D. and Raoult, D. (2002). "Rickettsia felis infection acquired in Europe and documented by polymerase chain reaction." Emerging Infectious Diseases, **8** (2): 207-208.

Richter, P. J., Jr., Kimsey, R. B., Madigan, J. E., Barlough, J. E., Dumler, J. S. and Brooks, D. L. (1996). "Ixodes pacificus (Acari: Ixodidae) as a vector of Ehrlichia equi (Rickettsiales: Ehrlichieae)." Journal of Medical Entomology, **33** (1): 1-5.

Rieg, S., Schmoldt, S., Theilacker, C., de With, K., Wolfel, S., Kern, W. V. and Dobler, G. (2011). "Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA) acquired in Southwestern Germany." BMC Infectious Diseases, **11**: 1-4.

Rikihisa, Y. (1991). "The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases." Clinical Microbiology Reviews, **4** (3): 286-308.

Rikihisa, Y. (2003). "Mechanisms to create a safe haven by members of the family Anaplasmataceae." Annals of the New York Academy of Sciences, **990**: 548-555.

Rolle, M., Mayer, A. (2007). Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 8, Stuttgart, Enke Verlag.

Roux, V. and Raoult, D. (2000). "Phylogenetic analysis of members of the genus Rickettsia using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB)." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **50 Pt 4**: 1449-1455.

Sager, H., Casati, S., Hartmeier, G. and Sommer, B. (2005). "Autochthonous cases of canine babesiosis in the canton Solothurn." Schweizer Archiv für Tierheilkunde, **147** (6): 259-265.

Sanchez, J. A., Pierce, K. E., Rice, J. E. and Wangh, L. J. (2004). "Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: an advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **101** (7): 1933-1938.

Sanogo, Y. O., Davoust, B., Inokuma, H., Camicas, J. L., Parola, P. and Brouqui, P. (2003). "First evidence of *Anaplasma platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodida) collected from dogs in Africa." The Onderstepoort Journal of Veterinary Research, **70** (3): 205-212.

Sayin, F., Dyncer, S., Karaer, Z., Cakmak, A., Yukary, B. A., Eren, H., Deger, S. and Nalbantoglu, S. (1997). "Status of the tick-borne diseases in sheep and goats in Turkey." Parassitologia, **39** (2): 153-156.

Schoeman, J. P. (2009). "Canine babesiosis." Onderstepoort Journal of Veterinary Research, **76** (1): 59-66.

Schorn, S., Pfister, K., Reulen, H., Mahling, M., Manitz, J., Thiel, C. and Silaghi, C. (2011). "Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany." Ticks and Tick-Borne Diseases, **2** (4): 196-203.

Schorn, S., Pfister, K., Reulen, H., Mahling, M. and Silaghi, C. (2011). "Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany." Parasites & Vectors, **4**: 135.

Schouls, L. M., Van De Pol, I., Rijpkema, S. G. and Schot, C. S. (1999). "Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks." Journal of Clinical Microbiology, **37** (7): 2215-2222.

Schwarz, G. (1978). "Estimating the Dimension of a Model." Annals of Statistics, **6** (2): 461-464.

Scoles, G. A., Papero, M., Beati, L. and Fish, D. (2001). "A relapsing fever group spirochete transmitted by *Ixodes scapularis* ticks." Vector Borne and Zoonotic Diseases, **1** (1): 21-34.

Severinsson, K., Jaenson, T. G., Pettersson, J., Falk, K. and Nilsson, K. (2010). "Detection and prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in seven study areas in Sweden." Parasites & Vectors, **3**: 66.

Silaghi, C., Gilles, J., Hohle, M., Fingerle, V., Just, F. T. and Pfister, K. (2008). "*Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany." Emerging Infectious Diseases, **14** (6): 972-974.

Silaghi, C., Gilles, J., Hohle, M., Pradel, I., Just, F. T., Fingerle, V., Kuchenhoff, H. and Pfister, K. (2008). "Prevalence of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in southern Germany." Journal of Medical Entomology, **45** (5): 948-955.

Silaghi, C., Woll, D., Hamel, D., Pfister, K., Mahling, M. and Pfeffer, M. (2012). "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." Parasites & Vectors, **5** (1): 1-14.

Skrabalo, Z. and Deanovic, Z. (1957). "Piroplasmosis in man; report of a case." Documenta de Medicina Geographica et Tropica, **9** (1): 11-16.

Smith, F. D., Ballantyne, R., Morgan, E. R. and Wall, R. (2011). "Prevalence, distribution and risk associated with tick infestation of dogs in Great Britain." Medical and Veterinary Entomology, **25** (4): 377-384.

Smith, F. D., Ballantyne, R., Morgan, E. R. and Wall, R. (2012). "Estimating Lyme disease risk using pet dogs as sentinels." Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, **35** (2): 163-167.

Solano-Gallego, L. and Baneth, G. (2011). "Babesiosis in dogs and cats-expanding parasitological and clinical spectra." Veterinary Parasitology, **181** (1): 48-60.

Solano-Gallego, L., Kidd, L., Trotta, M., Di Marco, M., Caldin, M., Furlanello, T. and Breitschwerdt, E. (2006). "Febrile illness associated with Rickettsia conorii infection in dogs from Sicily." Emerging Infectious Diseases, **12** (12): 1985-1988.

Solano-Gallego, L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldin, M. and Furlanello, T. (2008). "Babesia canis canis and Babesia canis vogeli clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease." Veterinary Parasitology, **157** (3-4): 211-221.

Sonenshine, D. E. (1991). Biology of Ticks. Oxford, Oxford University Press. 1-472.

Sonenshine, D. E. (1993). Biology of Ticks. Oxford, Oxford University Press. 1-488.

Sood, S. K., Salzman, M. B., Johnson, B. J. B., Happ, C. M., Feig, K., Carmody, L., Rubin, L. G., Hilton, E. and Piesman, J. (1997). "Duration of tick attachment as a predictor of the risk of Lyme disease in an area in which Lyme disease is endemic." Journal of Infectious Diseases, **175** (4): 996-999.

Spielman, A., Wilson, M. L., Levine, J. F. and Piesman, J. (1985). "Ecology of Ixodes dammini-borne human babesiosis and Lyme disease." Annual Review of Entomology, **30**: 439-460.

Stanczak, J., Racewicz, M., Kruminis-Lozowska, W. and Kubica-Biernat, B. (2002). "Coinfection of Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) in northern Poland with the agents of Lyme borreliosis (LB) and human granulocytic ehrlichiosis (HGE)." International Journal of Medical Microbiology, **291 Suppl 33**: 198-201.

Stanek, G. (2005). "Tick-borne pathogens in Central Europe." Wiener Klinische Wochenschrift, **117** (11-12): 373-380.

Stanek, G. (2009). "Pandora's Box: pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in Central Europe." Wiener Klinische Wochenschrift, **121** (21-22): 673-683.

Stanek, G., O'Connell, S., Cimmino, M., Aberer, E., Kristoferitsch, W., Granstrom, M., Guy, E. and Gray, J. (1996). "European Union Concerted Action on Risk Assessment in Lyme Borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis." Wiener Klinische Wochenschrift, **108** (23): 741-747.

Stanek, G., Wormser, G. P., Gray, J. and Strle, F. (2012). "Lyme borreliosis." Lancet, **379** (9814): 461-473.

Straubinger, R. K., Straubinger, A. F., Summers, B. A., Jacobson, R. H. and Erb, H. N. (1998). "Clinical manifestations, pathogenesis, and effect of antibiotic treatment on Lyme borreliosis in dogs." Wiener Klinische Wochenschrift, **110** (24): 874-881.

Strle, F., Nadelman, R. B., Cimperman, J., Nowakowski, J., Picken, R. N., Schwartz, I., Maraspin, V., Aguero-Rosenfeld, M. E., Varde, S., Lotric-Furlan, S. and Wormser, G. P. (1999). "Comparison of culture-confirmed erythema migrans caused by *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in New York State and by *Borrelia afzelii* in Slovenia." Annals of Internal Medicine, **130** (1): 32-36.

Suksawat, J., Pitulle, C., Arraga-Alvarado, C., Madrigal, K., Hancock, S. I. and Breitschwerdt, E. B. (2001). "Coinfection with three Ehrlichia species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure." Journal of Clinical Microbiology, **39** (1): 90-93.

Summers, B. A., Straubinger, A. F., Jacobson, R. H., Chang, Y. F., Appel, M. J. and Straubinger, R. K. (2005). "Histopathological studies of experimental lyme disease in the dog." Journal of Comparative Pathology, **133** (1): 1-13.

Sytykiewicz, H., Karbowski, G., Werszko, J., Czerniewicz, P., Sprawka, I. and Mitrus, J. (2012). "Molecular screening for *Bartonella henselae* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato co-existence within *Ixodes ricinus* populations in central and eastern parts of Poland." Annals of Agricultural and Environmental Medicine, **19** (3): 451-456.

Tabar, M. D., Altet, L., Francino, O., Sanchez, A., Ferrer, L. and Roura, X. (2008). "Vector-borne infections in cats: molecular study in Barcelona area (Spain)." Veterinary Parasitology, **151** (2-4): 332-336.

Takano, A., Nakao, M., Masuzawa, T., Takada, N., Yano, Y., Ishiguro, F., Fujita, H., Ito, T., Ma, X., Oikawa, Y., Kawamori, F., Kumagai, K., Mikami, T., Hanaoka, N., Ando, S., Honda, N., Taylor, K., Tsubota, T., Konnai, S., Watanabe, H., Ohnishi, M. and Kawabata, H. (2011). "Multilocus sequence typing implicates rodents as the main reservoir host of human-pathogenic *Borrelia garinii* in Japan." Journal of Clinical Microbiology, **49** (5): 2035-2039.

Thomas, R. J., Dumler, J. S. and Carlyon, J. A. (2009). "Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis." Expert Review of Anti-Infective Therapy, **7** (6): 709-722.

Töpfer, K. H. and 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.

Toutoungi, L. N. and Gern, L. (1993). "Ability of transovarially and subsequent transstadially infected *Ixodes hexagonus* ticks to maintain and transmit *Borrelia burgdorferi* in the laboratory." Experimental & Applied Acarology, **17** (8): 581-586.

Tuomi, J. (1966). "Studies in epidemiology of bovine tick-borne fever in Finland and a clinical description of field cases." Annales Medicinæ Experimentalis et Biologiae Fenniae, **44**: Suppl 6:1-62.

Uilenberg, G., Franssen, F. F., Perie, N. M. and Spanjer, A. A. (1989). "Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature." The Veterinary Quarterly, **11** (1): 33-40.

van Burgel, N. D., Kraiczy, P., Schuijt, T. J., Zipfel, P. F. and van Dam, A. P. (2010). "Identification and functional characterisation of Complement Regulator Acquiring Surface Protein-1 of serum resistant *Borrelia garinii* OspA serotype 4." BMC Microbiology, **10**: 1-12.

Villaescusa, A., Tesouro, M. A., Garcia-Sancho, M., Ayllon, T., Rodriguez-Franco, F. and Sainz, A. (2012). "Evaluation of peripheral blood lymphocyte subsets in family-

owned dogs naturally infected by Ehrlichia canis." Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, **35** (4): 391-396.

Vogelr, M., Zubrikova, D. and Pfister, K. (2012). "Prevalence of Borrelia burgdorferi s. l. in Ixodes ricinus ticks from four localities in Bavaria, Germany." Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, **125** (9-10): 401-406.

von Loewenich, F. D., Baumgarten, B. U., Schroppel, K., Geissdorfer, W., Rollinghoff, M. and Bogdan, C. (2003). "High diversity of ankA sequences of Anaplasma phagocytophilum among Ixodes ricinus ticks in Germany." Journal of Clinical Microbiology, **41** (11): 5033-5040.

von Loewenich, F. D., Geissdorfer, W., Disque, C., Matten, J., Schett, G., Sakka, S. G. and Bogdan, C. (2010). "Detection of "Candidatus Neoehrlichia mikurensis" in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant." Journal of Clinical Microbiology, **48** (7): 2630-2635.

Walter, G. (1982). "Transmission of Babesia microti by nymphs of Dermacentor marginatus, D. reticulatus, Haemaphysalis punctata, Rhipicephalus sanguineus and Ixodes hexagonus." Zeitschrift für Parasitenkunde, **66** (3): 353-354.

Wasmoen, T. L., Sebring, R. W., Blumer, B. M., Chavez, L. G., Jr., Chu, H. J. and Acree, W. M. (1992). "Examination of Koch's postulates for Borrelia burgdorferi as the causative agent of limb/joint dysfunction in dogs with borreliosis." Journal of the American Veterinary Medical Association, **201** (3): 412-418.

Weitschat, W. (2004). "Zecken im Bernstein - wahre Raritäten." Immunologie in Wissenschaft und Praxis, **1**: 11-12.

Welc-Faleciak, R., Bajer, A., Paziewska-Harris, A., Baumann-Popczyk, A. and Sinski, E. (2012). "Diversity of Babesia in Ixodes ricinus ticks in Poland." Advances in Medical Sciences: 1-6.

Welinder-Olsson, C., Kjellin, E., Vaht, K., Jacobsson, S. and Wenneras, C. (2010). "First case of human "Candidatus Neoehrlichia mikurensis" infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia." Journal of Clinical Microbiology, **48** (5): 1956-1959.

Werth, D. (1989). "The occurrence and significance of Chlamydia psittaci and Coxiella burnetii in dogs and cats. A study of the literature." Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift, **102** (5): 156-161.

Wielinga, P. R., Gaasenbeek, C., Fonville, M., de Boer, A., de Vries, A., Dimmers, W., Akkerhuis Op Jagers, G., Schouls, L. M., Borgsteede, F. and van der Giessen, J. W. (2006). "Longitudinal analysis of tick densities and *Borrelia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* infections of *Ixodes ricinus* ticks in different habitat areas in The Netherlands." Applied and Environmental Microbiology, **72** (12): 7594-7601.

Wirtgen, M., Nahayo, A., Linden, A., Losson, B., Garigliany, M. and Desmecht, D. (2011). "Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in *Dermacentor reticulatus* ticks." The Veterinary Record, **168** (7): 195.

Wittwer, C. T., Reed, G. H., Gundry, C. N., Vandersteen, J. G. and Pryor, R. J. (2003). "High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen." Clinical Chemistry, **49** (6 Pt 1): 853-860.

Wodecka, B. (2003). "Detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* DNA in *Ixodes ricinus* ticks in North-western Poland." Annals of Agricultural and Environmental Medicine, **10** (2): 171-178.

Wojcik-Fatla, A., Bartosik, K., Buczek, A. and Dutkiewicz, J. (2012). "*Babesia microti* in Adult *Dermacentor reticulatus* Ticks from Eastern Poland." Vector Borne Zoonotic Diseases: 1-3.

Wormser, G. P., Dattwyler, R. J., Shapiro, E. D., Halperin, J. J., Steere, A. C., Klempner, M. S., Krause, P. J., Bakken, J. S., Strle, F., Stanek, G., Bockenstedt, L., Fish, D., Dumler, J. S. and Nadelman, R. B. (2006). "The clinical assessment, treatment, and prevention of lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America." Clinical Infectious Diseases **43** (9): 1089-1134.

Yabsley, M. J., Murphy, S. M., Luttrell, M. P., Wilcox, B. R., Howerth, E. W. and Munderloh, U. G. (2008). "Characterization of 'Candidatus *Neoehrlichia lotoris*' (family Anaplasmataceae) from raccoons (*Procyon lotor*)." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **58** (Pt 12): 2794-2798.

Yeagley, T. J., Reichard, M. V., Hempstead, J. E., Allen, K. E., Parsons, L. M., White, M. A., Little, S. E. and Meinkoth, J. H. (2009). "Detection of *Babesia gibsoni* and the canine small *Babesia* 'Spanish isolate' in blood samples obtained from dogs confiscated from dogfighting operations." Journal of the American Veterinary Medical Association, **235** (5): 535-539.

Yeh, M. T., Bak, J. M., Hu, R., Nicholson, M. C., Kelly, C. and Mather, T. N. (1995). "Determining the duration of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) attachment to tick-bite victims." Journal of Medical Entomology, **32** (6): 853-858.

Zahler, M., Rinder, H. and Gothe, R. (2000). "Genotypic status of *Babesia microti* within the piroplasms." Parasitology Research, **86** (8): 642-646.

Zahler, M., Rinder, H., Schein, E. and Gothe, R. (2000). "Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs." Veterinary Parasitology, **89** (3): 241-248.

Zahler, M., Rinder, H., Zwegarth, E., Fukata, T., Maede, Y., Schein, E. and Gothe, R. (2000). "'*Babesia gibsoni*' of dogs from North America and Asia belong to different species." Parasitology, **120** (Pt 4): 365-369.

Zahler, M., Schein, E., Rinder, H. and Gothe, R. (1998). "Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs." Parasitology Research, **84** (7): 544-548.

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Die drei in der Studie behandelten Zeckenspezies und ihre taxonomische Einordnung nach NCBI-Schlüssel	2
Tab. 2: In Europa relevante Infektionserreger, die durch <i>I. ricinus</i> , <i>I. hexagonus</i> und <i>D. reticulatus</i> übertragen werden, verursachte Erkrankungen sowie Übertragungsmodi, mit * markierte Erreger sind hundepathogen.....	9
Tab. 3: Zeckengenera der Studie und durch sie übertragene <i>Babesia</i> spp., mit * markierte Erreger sind zoonotische Erreger	12
Tab. 4: Die in der Studie untersuchten Zeckengenera als Reservoir von <i>Rickettsia</i> Spezies	16
Tab. 5: Vermutliche Dauer der Blutmahlzeit von gesogenen weiblichen <i>I. ricinus</i> und <i>D. reticulatus</i> auf Basis von SI-Messungen (Dautel et al., 2006).	27
Tab. 6: Anzahl der vom 1. März 2010 – 31. März 2011 gesammelten Zecken, nach Spezies, Geschlecht/Stadium bestimmt (Beck, 2012).	35
Tab. 7: Verteilung der zufällig ausgewählten Zecken für die jeweiligen PCR-Untersuchungen	39
Tab. 8: Verwendete Agarosekonzentration je nach Fragmentgröße	48
Tab. 9: Prävalenzen von <i>Babesia</i> spp. in Berliner Zecken mit 95 % Konfidenzintervall (KI).	54
Tab. 10: Prävalenzen von <i>Rickettsia</i> spp. in Berliner Zecken mit 95 % Konfidenzintervall (KI).	54
Tab. 11: Prävalenzen von Anaplasmataceae bei Berliner Zecken mit 95 % Konfidenzintervall (KI).	55
Tab. 12: Prävalenzen von <i>Borrelia</i> spp. in Berliner Zecken mit 95 % Konfidenzintervall (KI).	57
Tab. 13: Auf Anaplasmataceae, <i>Babesia</i> spp., <i>Borrelia</i> spp. und <i>Rickettsia</i> spp. untersuchte <i>I. ricinus</i> und <i>I. hexagonus</i> sowie auf <i>Babesia</i> spp. und <i>Rickettsia</i> spp. untersuchte <i>D. reticulatus</i>	62
Tab. 14: PCR-positive weibliche Zecken aufgeteilt in zwei Gruppen mit SI < 2,31 und ≥ 2,31 (entspricht einer Dauer der Blutmahlzeit von 2 Tagen); p-Werte des Mid-P Exakt Test um signifikante Unterschiede zwischen Prävalenzen für beide Gruppen zu verdeutlichen	66
Tab. 15: Anzahl der mit Infektionserregern infizierten Zecken in der ersten Jahreshälfte (03/2010-07/2010) und in der zweiten Jahreshälfte (08/2010-12/2010)	74

8.4 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: <i>I. ricinus</i> , adult, weiblich. Aufnahme Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, Freie Universität Berlin.....	4
Abb. 2: <i>I. hexagonus</i> , adult, weiblich (André Karwath, Wikimedia Commons, lizenziert unter CreativeCommons-Lizenz BY-SA 2.5, URL: http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.5/deed.de)	5
Abb. 3: <i>D. reticulatus</i> , adult, weiblich (Aufnahme Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, Freie Universität Berlin).....	6
Abb. 4: <i>I. ricinus</i> , weiblich. Messungen zur Berechnung des SI als Quotient von Körperlänge ausgehend von der Basis Capituli (A) geteilt durch die Breite des Scutum an seiner breitesten Stelle (B) (Aufnahme Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin).	36
Abb. 5: Vektorkarte pCR-Blunt II-TOPO (www.invitrogen.com).....	40
Abb. 6: Prozentualer Anteil der weiblichen Zecken, die mindestens den entsprechenden SI auf der x-Achse aufweisen. In rot <i>I. ricinus</i> , in blau <i>D. reticulatus</i> dargestellt. Die senkrechten Linien bringen den jeweiligen SI mit der Dauer der Blutmahlzeit in Tagen in Zusammenhang (Dautel et al., 2006). Bsp: Etwa 40 % von <i>D. reticulatus</i> wiesen einen SI von >3 auf, dies entspricht einer Dauer des Saugaktes zwischen 2 und 3 Tagen.	51
Abb. 7: SIs männlicher (männl.) und weiblicher (weibl.) Zecken im Vergleich. *** Signifikante Unterschiede mit $p < 0,001$ zwischen <i>D. reticulatus</i> (<i>D. ret.</i>) männlich und <i>I. ricinus</i> (<i>I. ric</i>) männlich sowie zwischen <i>D. reticulatus</i> weiblich sowie <i>I. hexagonus</i> (<i>I. hex.</i>) weiblich. Median und Mittelwert als schwarze und rote horizontale Linie.....	52
Abb. 8: Vergleich des SI weiblicher Zecken in den Gruppen „Kurz“, „Mittel“ und „Lang“. Mittelwert und Median sind als rote bzw. schwarze horizontale Linie dargestellt. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Median der SIs der einzelnen Gruppen erkennen. 53	
Abb. 9: Vergleich der SIs weiblicher Zecken der drei Spezies <i>D. reticulatus</i> (<i>D. ret.</i>), <i>I. ricinus</i> (<i>I. ric.</i>) und <i>I. hexagonus</i> (<i>I. hex.</i>) in den Gruppen „kurz“, „mittel“ und „lang“. * $p < 0,05$ im Kruskal-Wallis Test und Dunn´s Test für post hoc Vergleiche. Mittelwert und Median als rote bzw. schwarze horizontale Linie dargestellt.	53
Abb. 10: HRM-PCR zur Unterscheidung von <i>A. phagocytophilum</i> und <i>Cand. Neoehrlichia mikurensis</i> . (A) Amplifikationskurven acht verschiedener Zeckenproben, die positiv für <i>A. phagocytophilum</i> (<i>Ana.</i> ⁺) oder <i>Cand. Neoehrlichia mikurensis</i> (<i>Neo.</i> ⁺) sind, mit einer koinfizierten Milzprobe von <i>Apodemus agrarius</i> (<i>Co-Inf.</i>), Positivkontrollen (<i>Ana. Contr.</i> , <i>Neo. Contr.</i>) und einer no-template-Kontrolle (NTC), die statt Probenmaterial mit nukleasefreiem Wasser versetzt wurde. (B) Normalisierte Schmelzkurven desselben Datensatzes. (C) Differenzkurven desselben Datensatzes. Der Mittelwert des Fluoreszenzsignals von <i>A. phagocytophilum</i> -positiven Proben subtrahiert von allen anderen Einzelproben.	56
Abb. 11: Verwandtschaftsbaum von <i>Borrelia</i> spp. für das <i>hbb</i> Gen, Zugangsnummern von Genbank [®] in Klammern hinter jeweiligem Speziesnamen. Die verwendete Sequenz für <i>B. miyamotoi</i> entstammt der aktuellen Studie und wurde auf www.ebi.ac.uk veröffentlicht.	58
Abb. 12: Infektionen und Koinfektionen von <i>I. ricinus</i> mit <i>Borrelia</i> spp. (B), <i>Rickettsia</i> spp. (R), <i>A. phagocytophilum</i> (A), <i>Cand. Neoehrlichia mikurensis</i> (N), <i>Babesia</i> spp. (P) und nicht infizierte (<i>n.inf.</i>) <i>I. ricinus</i> . Die Einzelerregerinfektionen sind abzüglich der Proben dargestellt, die in die Koinfektionen eingehen.	59
Abb. 13: Infektionen und Koinfektionen von <i>I. hexagonus</i> mit <i>Borrelia</i> spp. (B), <i>Rickettsia</i> spp. (R), <i>A. phagocytophilum</i> (A), <i>Cand. Neoehrlichia mikurensis</i> (N), <i>Babesia</i> spp. (P) und nicht infizierte (<i>n.inf.</i>) <i>I. hexagonus</i> . Die Einzelerregerinfektionen sind abzüglich der Proben dargestellt, die in die Koinfektionen eingehen.....	60
Abb. 14: Infektionen von <i>D. reticulatus</i> mit <i>Rickettsia</i> spp. (R) und nicht infizierte (<i>n.inf.</i>) <i>D. reticulatus</i>	61
Abb. 15: A) Dichtekurve des SI für weibliche und männliche nicht infizierte Zecken (n=798). Auf der x-Achse ist der SI gegen den prozentualen Anteil der Zecken auf der y-Achse aufgetragen. B) Dichtekurve des SI für weibliche und männliche infizierte Zecken (n=449).	

Auf der x-Achse ist der SI gegen den prozentualen Anteil der Zecken auf der y-Achse aufgetragen. 65

Abb. 16: Mittlerer SI aller I. hexagonus (n=146) pro Monat als durchgezogene Linie mit Kreuzen dargestellt. Gestrichelte Linien und Punkte geben die Standardabweichung an..... 67

Abb. 17: Mittlerer SI aller I. ricinus (n=772) pro Monat als durchgezogene Linie mit Kreuzen dargestellt. Gestrichelte Linien und Punkte geben die Standardabweichung an...... 67

Abb. 18: Mittlerer SI aller D. reticulatus (n=776) pro Monat als durchgezogene Linie mit Kreuzen dargestellt. Gestrichelte Linien und Punkte geben die Standardabweichung an..... 68

Abb. 19: Anzahl und Anteil von mit A. phagocytophilum (n=50), Cand. Neoehrlichia mikurensis (n=33) oder Babesia spp. (n=5) infizierten I. ricinus für die Monate 03/2010-03/2011. 69

Abb. 20: Anzahl und Anteil von mit Rickettsia spp. (n=125) oder Borrelia spp. (n=89) infizierten I. ricinus für die Monate 03/2010-03/2011. 69

Abb. 21: Anzahl und Anteil von mit A. phagocytophilum (n=6), Cand. Neoehrlichia mikurensis (n=9) oder Babesia spp. (n=3) infizierten I. hexagonus für die Monate 03/2010-03/2011..... 71

Abb. 22: Anzahl und Anteil von mit Rickettsia spp. (n=67) oder Borrelia spp. (n=17) infizierten I. hexagonus für die Monate 03/2010-03/2011. 71

Abb. 23: Anzahl und Anteil von mit Rickettsia spp. (n=107) infizierten D. reticulatus für die Monate 03/2010-03/2011. 72

Abb. 24: Darstellung der Anzahl von abgegebenen Zecken pro Monat, nach Zeckenspezies aufgetrennt (Beck, 2012)...... 73

8.5 Publikationsverzeichnis

Publikationen

Schreiber, C., Krücken, J., Beck, S., Pachnicke, S., Krieger, K., Groß, M., Kohn, B., von Samson-Himmelstjerna, G., (2013) „Infectious agents in ticks collected from dogs in Berlin/Brandenburg, Germany“. In Vorbereitung.

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 discriminates *Anaplasma phagocytophilum* and *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*“. Journal of Clinical Microbiology, **51** (6): 1958-1961.

Beck, S., Schreiber, C., Krücken, J., Schein, E., Baldermann, C., von Samson-Himmelstjerna, G., Kohn, B., (2012). „Tick infestation and tick prophylaxis in dogs in Northeast Germany: a prospective study“. In Vorbereitung.

Schreiber, C., Krücken, J., Beck, S., Pachnicke, S., Krieger, K.J., Kohn, B., von Samson-Himmelstjerna, G., (2012). „Zeckenübertragene Infektionserreger bei Hunden im Raum Berlin/Brandenburg.“ VetMedReport, **5** (36): S.6. ISSN: 1866-5152.

Schreiber, C., Krücken, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Kohn, B. (2012). „Fallbericht zum Thema Vektorenkrankheiten des Hundes: Leishmaniose bei einem Bobtailrüden“. www.bayer-tfa.de

Schreiber, C., Werner, H., Krücken, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Kohn, B. (2012). „Fallbericht zum Thema zeckenübertragene Erkrankungen des Hundes: Anaplasrose bei einem Labradorrüden“. www.bayer-tfa.de

Vorträge

Schreiber, C., Krücken, J., Beck, S., Pachnicke, S., Krieger, K.J., Kohn, B., von Samson-Himmelstjerna, G., (2012). „Zeckenübertragene Infektionserreger bei Hunden im Raum Berlin/Brandenburg.“ Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten. S. 49-50. Hannover, 2.-4. Juli 2012. ISBN: 9-783941-552180.

Schreiber, C., Krücken, J., Beck, S., G., Pachnicke, S., Krieger, K.J., Kohn, B., von Samson-Himmelstjerna, (2012). „Zeckenübertragene Infektionserreger bei Hunden im Raum Berlin/Brandenburg.“ 7. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar „Biomedical Sciences“ am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin. S. 26. Berlin, 13. Juli 2012. ISBN: 978-3-86387-153-6.

Schreiber, C., Krücken, J., Beck, S., Pachnicke, S., Krieger, K.J., Kohn, B., von Samson-Himmelstjerna, G., (2012). „Zeckenübertragene Infektionserreger bei Hunden im Raum Berlin/Brandenburg.“, Parasitologisches Kolloquium am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, Freie Universität Berlin. Berlin, 10. August 2012.

Poster

Schreiber, C., Krücken, J., Beck, S., Pachnicke, S., Krieger, K.J., Kohn, B., von Samson-Himmelstjerna, G., (2013). „Zeckenübertragene Infektionserreger bei Hunden im Raum Berlin/Brandenburg: Prävalenzen und Untersuchungen zum Infektionsrisiko“, 21. Jahrestagung der FG Innere Medizin und klinische Labordiagnostik der DVG (Innlab). München, 1./2.2.2013. Tierärztliche Praxis Kleintiere. 1/2013, Schattauer Verlag, ISBN 1434-1239, S. 27-28.

8.6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Kohn und Herrn Prof. von Samson-Himmelstjerna für die Vergabe des Promotionsthemas bedanken. Herrn Prof. von Samson-Himmelstjerna danke ich außerdem für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und Frau Prof. Kohn für die regelmäßige und gewinnbringende Korrespondenz. Ich danke Ihnen beiden für die Ermöglichung der Teilnahme an mehreren interessanten Fachtagungen und für Ihre verlässliche und freundliche Hilfe bei der Durchführung des Projektes.

Besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. Jürgen Krücken, der eine unverzichtbare Hilfe bei der geleisteten Laborarbeit und der Verfassung dieser Arbeit war. Vielen Dank für die kompetente Betreuung. Bei Frau Prof. Demeler möchte ich mich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes sowie für ihre Korrekturen bedanken.

Herrn Marcus Groß danke ich für seine großartige und geduldige Hilfe bei der Klärung statistischer Fragestellungen.

Danke Stephanie Beck für die Einführung in das Projekt und die Überlassung der mühsam gesammelten Zecken.

Ich danke Mareen und Denny für die herausragende zeckenfachkräftige Unterstützung, insbesondere Mareen für die professionelle Einarbeitung. Ich danke auch Anja, Julia, Maxi, Maja, Jana, Basti, Daniel, Rike, Tini, Sofia und Melanie. Liebe Paradocs, es war mir eine Ehre mit Euch zu arbeiten. Ihr alle habt mich, jeder auf seine eigene Art, sehr unterstützt und dazu beigetragen, dass mir die Zeit meiner Doktorarbeit immer positiv in Erinnerung bleiben wird. Danke für die tolle Zeit!

Auch möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin in Berlin für ihre Unterstützung und so manches nette fachfremde Gespräch bedanken.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für ihren Zuspruch und ihre bedingungslose Unterstützung bei Allem was ich mir vornehme. Merci pour Sheila. Ein großes Dankeschön gilt meinem Vater, der sich mit Hochgeschwindigkeit um einen Großteil der Korrekturen gekümmert hat. Danke meiner Schwester Christine für den Durchblick. Meinen beiden Schwestern danke ich für die Motivation durch die vielen interessierten Nachfragen und die verlässliche Hilfe in allen Lebenslagen. Ich danke meinem Simon für die richtige Dosis aus Ablenkung und Motivation während dieser Zeit.

Bei der Firma Bayer Vital sowie der Firma Bayer Animal Health, insbesondere bei meinen Ansprechpartnern Herrn Dr. Pachnicke und Herrn Dr. Krieger, möchte ich mich hiermit herzlich für die finanzielle Unterstützung meines Projektes sowie das stets motivierende Feedback bedanken.

8.7 Selbstständigkeitserklärung

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

Hamburg, den 14.05.2013

Cécile Schreiber