

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

Zecken und durch Zecken übertragbare Krankheitserreger bei Rindern im Khentii Aimag, Mongolei

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

vorgelegt von
Timon Fischer
Tierarzt aus Berlin

Berlin 2018
Journal-Nr.: 4026

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

**Zecken und durch Zecken übertragbare Krankheitserreger bei Rindern im
Khentii Aimag, Mongolei**

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

vorgelegt von
Timon Fischer
Tierarzt
aus Berlin

Berlin 2018
Journal-Nr.: 4026

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Prof. Dr. Peter Henning Clausen
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Jabbar S. Ahmed
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Martin Pfeffer

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

cattle; *Metastigmata*; *Babesia*; *Theileria*; *Anaplasma*; *Ehrlichia*; *Rickettsia*; *Borrelia*; disease transmission; disease vectors; vector potential; epidemiology; polymerase chain reaction; Mongolia

Tag der Promotion: 27.02.2018

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: 978-3-86387-890-0

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2018

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2018

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Diese Arbeit ist meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Glossar	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Die Biologie und Bedeutung der Zecken	2
2.2 Durch Zecken übertragbare Krankheitserreger	4
2.2.1 Babesien	4
2.2.2 Theilerien	9
2.2.3 Anaplasmen	12
2.2.4 Ehrlichien	13
2.2.5 Rickettsien	14
2.2.6 Borrelien	14
2.3 Diagnostische Methoden zum Nachweis von durch Zecken übertragbaren Erregern	18
2.4 Mongolei	19
2.4.1 Die Mongolei	19
2.4.2 Nutztierhaltung in der Mongolei	20
2.4.3 Zeckenarten in der Mongolei, deren Verbreitung und Bekämpfung	21
2.4.4 Zeckenassoziierte Krankheitserreger von Nutztieren in der Mongolei	24
2.5 Zielsetzung der Studie	26
3 Material und Methoden	27
3.1 Herdenfragebogen	27

3.2 Probensammlung in der Mongolei	27
3.3 Lagerung und Transport der Proben nach Deutschland	32
3.4 Laborarbeit in Deutschland	32
3.4.1 Identifizierung der adulten Zecken	32
3.4.2 Identifizierung der juvenilen Zeckenstadien.....	37
3.4.3 DNS Extraktion aus adulten Zecken	38
3.4.4 DNS Extraktion aus Zeckenlarven.....	39
3.4.5 DNS Extraktion aus Vollblutproben	39
3.4.6 DNS Extraktion aus auf Whatman FTA [®] Filtercards aufgetragenen Blutproben.....	40
3.4.7 DNS Konzentrationsmessung	40
3.4.8 Prinzip eines PCR basierten Reverse Line Blot Hybridization Assays	41
3.4.9 PCR für die anschließende Durchführung eines Reverse Line Blot Hybridization Assays	43
3.4.9.1 PCR für den Nachweis des 18S-rRNS Gens der <i>Babesia</i> spp. und <i>Theileria</i> spp.	44
3.4.9.2 PCR für den Nachweis des 16S-rRNS Gens der <i>Rickettsiales</i>	44
3.4.9.3 PCR für den Nachweis der 5S-23S Region der <i>Borrelia</i> spp.....	44
3.4.10 Gelelektrophorese	48
3.4.11 Reverse Line Blot Hybridization Assay (RLB)	48
3.4.11.1 Präparation der RLB Membran.....	48
3.4.11.2 Durchführung eines RLB.....	53
3.4.11.3 "Strippen" der RLB-Membran.....	54
3.4.12 PCR für eine anschließende Sequenzierung der PCR-Produkte.....	54
3.4.12.1 PCR des 18S-rRNS Gens der Babesien und Theilerien, des 16S- rRNS Gens der <i>Rickettsiales</i> sowie der Region 5S-23S der ribosomalen DNS der Borrelien für eine anschließende Sequenzierung	54
3.4.13 Vorbereitung der PCR-Produkte zur Sequenzierung	55

3.4.14 Phylogenetische Analyse einer in dieser Studie gefundenen unbekanntes	
<i>Anaplasma</i> sp.	56
3.4.14.1 PCR des MSP5 Gens der Anaplasmen für eine anschließende	
Sequenzierung	56
3.4.14.2 PCR des 16S-rRNS Gens der Anaplasmen für eine	
anschließende Sequenzierung.....	57
3.4.14.3 PCR des GroEL Gens der Anaplasmen für eine anschließende	
Sequenzierung	58
3.4.14.4 Durchführung der phylogenetischen Analyse	58
3.5 Material.....	60
3.5.1 Geräte	60
3.5.2 Laborkits	61
3.5.3 DNS Polymerasen	61
3.5.4 Marker	62
3.5.5 Chemikalien	62
3.5.6 Verbrauchsmaterialien	64
3.5.7 Software	65
3.5.8 Herstellung von Lösungen, Puffern und Reagenzien.....	66
4 Ergebnisse	67
4.1 Zecken	67
4.1.1 Adulte Zecken aus der Vegetation	67
4.1.1.1 Entomologische Untersuchung der adulten Zecken aus der	
Vegetation.....	67
4.1.1.2 RLB-Untersuchung der adulten Zecken aus der Vegetation.....	67
4.1.2 Adulte Zecken von Rindern	72
4.1.2.1 Entomologische Untersuchung der adulten Zecken von Rindern	72
4.1.3 Juvenile Zeckenstadien	74
4.1.3.1 Bestimmung der Art der juvenilen Zeckenstadien	74
4.1.3.2 RLB-Untersuchung der juvenilen Zeckenstadien.....	74

4.2 Blutproben	77
4.2.1 RLB Untersuchung der Blutproben	77
4.3 Phylogenetische Analyse der in dieser Studie gefundenen uncharakterisierten <i>Anaplasma</i> sp.	79
4.4 Fragebogenauswertung	82
5 Diskussion	83
5.1 Fragestellung	83
5.2 Besprechung der Methoden	83
5.2.1 Auswahl der Studienregion	83
5.2.2 Wahl des Studienzeitraums	84
5.2.3 Zeckensammlung	85
5.2.4 Zeckenidentifikation	87
5.2.5 Auswahl der Herden und Rinder	87
5.2.6 Blutproben	88
5.2.7 Untersuchung der Zecken und Blutproben auf Pathogene	90
5.2.8 Herdenfragebogen	90
5.3 Besprechung der Ergebnisse	92
5.3.1 Zecken	92
5.3.1.1 Gefundene Zeckenarten	92
5.3.1.2 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung der adulten Zecken aus der Vegetation	93
5.3.1.3 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung der juvenilen Zeckenstadien	96
5.3.2 Blutproben	97
5.3.2.1 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen der Blutproben	97
5.3.3 Phylogenetische Analyse	99
5.3.4 Fragebogen	99

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick.....	100
6 Zusammenfassung.....	103
7 Summary.....	105
8 Literaturverzeichnis.....	107
9 Anhang.....	120
9.1 Liste der untersuchten Herden.....	120
9.2 Liste der gefangenen Nager.....	124
9.3 Herdenfragebogen.....	126
9.4 Für die phylogenetische Analyse verwendete Gensequenzen der gefundenen <i>Anaplasma</i> sp.	127
10 Publikationsverzeichnis.....	130
11 Danksagung.....	131
12 Selbstständigkeitserklärung.....	133

Glossar

A	Adenin
<i>A.</i>	<i>Anaplasma</i>
Abb.	Abbildung
Aimag	entspricht einem Bundesland
<i>Am.</i>	<i>Amblyomma</i>
AMA	Apical Membrane Antigen (Apikales Membranantigen)
Aqua bidest	zweifach destilliertes Wasser
<i>B.</i>	<i>Babesia</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
<i>Bor.</i>	<i>Borrelia</i>
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
<i>D.</i>	<i>Dermacentor</i>
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDAC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanosin
× g	Beschleunigung als Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
<i>Hae .</i>	<i>Haemaphysalis</i>
<i>H.</i>	<i>Hyalomma</i>
<i>I.</i>	<i>Ixodes</i>
Inc.	incorporated (bedeutet, dass die Firma ins Handelsregister eingetragen ist)
ITS	Internal Transcribed Spacer
Jurte	traditionelles Nomadenzelt der Mongolen; wird auch "Ger" genannt
km ²	Quadratkilometer
LD	Loading Dye (Ladepuffer)
m	männlich

Min.	Minute/n
Mio.	Millionen
MKS	Maul- und Klauenseuche
ml	Milliliter
MPSP	Major Piroplasm Surface Protein (Großes Piroplasmen Oberflächenprotein)
MSA	Merozoite Surface Antigen (Merozoitenoberflächenantigen)
µl	Mikroliter
<i>N.</i>	<i>Neoehrlichia</i>
NaOH	Natriumhydroxid
nPCR	nested Polymerase Chain Reaction (nested Polymerase Kettenreaktion)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
<i>R.</i>	<i>Rickettsia</i>
<i>Rh.</i>	<i>Rhipicephalus</i>
RLB	Reverse Line Blot Hybridisation Assay
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
s.l.	sensu lato
sp.	für Spezies
spp.	Species pluralis
s.s.	sensu stricto
SSPE	Saline-Sodium Phosphate-EDTA Hybridization Buffer
Sek.	Sekunde/n
Somon	entspricht einem Landkreis
T	Tymin
<i>T.</i>	<i>Theileria</i>
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
UpM	Umdrehungen pro Minute
USA	United States of Amerika (Vereinigte Staaten von Amerika)
UV-Licht	ultraviolettes Licht
v. Chr.	vor Christus
w	weiblich
®	Warenzeichen

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aimags der Mongolei modifiziert nach Anonym(a) (2017)	20
Abb. 2: Verbreitungszonen der in der Mongolei bekannten Zeckenarten nach Dash (1986).....	23
Abb. 3: Die Somone des Aimags Khentii modifiziert nach Anonym(c) (2017).....	29
Abb. 4: Mongolische Rinder in einem Pferch vor der Probennahme mit zwei mongolischen Helfern, Khentii 2013	30
Abb. 5: Ein mongolischer Nomade hilft beim Einfangen seiner Rinder, Khentii 2013.....	30
Abb. 6: Zeckenbefall am Trierl eines mongolischen Rindes, Khentii 2013.....	31
Abb. 7: <i>Dermacentor nuttalli</i> Zecken auf einer mongolischen Jurte, Khentii 2013	31
Abb. 8: <i>Dermacentor nuttalli</i> , Morphologie des Männchens nach Arthur (1962)	34
Abb. 9: <i>Dermacentor nuttalli</i> , Morphologie des Weibchens nach Arthur (1962).....	36
Abb. 10: Prinzip des PCR basierten Reverse Line Blot Hybridization Assays (RLB)	42
Abb. 11: Männliche adulte <i>Dermacentor nuttalli</i> Zecke von dorsal.....	68
Abb. 12: Männliche adulte <i>Dermacentor nuttalli</i> Zecke von ventral	68
Abb. 13: Weibliche adulte <i>Dermacentor nuttalli</i> Zecken von dorsal	69
Abb. 14: Weibliche adulte <i>Dermacentor nuttalli</i> Zecken von ventral.....	69
Abb. 15: <i>Dermacentor nuttalli</i> Zeckenlarve von dorsal.....	76
Abb. 16: <i>Dermacentor nuttalli</i> Zeckenlarve von ventral	76
Abb. 17: Phylogenetische Analyse von Anaplasmatataceae mit der "Maximum- likelihood" Methode.....	80

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Systematische Einordnung der Zecken (<i>Ixodida</i>)	2
Tab. 2: Babesienarten des Rindes, ihre ixodiden Hauptvektoren und ihre bekannte Verbreitung nach Bock <i>et al.</i> (2004), Uilenberg (2006) und Schnittger <i>et</i> <i>al.</i> (2012).....	8
Tab. 3: <i>Theileria</i> spp., die Boviden infizieren können, ihre Hauptvektoren und ihr Verbreitungsgebiet nach Bishop <i>et al.</i> (2004)	11
Tab. 4: Aktuell bekannte Arten des <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato Komplexes nach Rudenko <i>et al.</i> (2011).....	16
Tab. 5: Liste der in der Mongolei auftretenden Zeckenarten nach Daš <i>et al.</i> (1989).....	22
Tab. 6: Ansatz des Mastermixes einer PCR Reaktion für eine anschließende Sequenzierung der ITS-2 Region von Zecken	38
Tab. 7: "ITS2-PRIMER" Protokoll des Thermocyclers für die Amplifizierung der ITS2 Region von Zecken	38
Tab. 8: Liste der verwendeten Primer	43
Tab. 9: Ansatz des Mastermixes einer PCR Reaktion zur anschließenden Durchführung eines RLB	45
Tab. 10: Protokoll des Thermocyclers für die Durchführung einer Babesien und Theilerien PCR sowie einer <i>Rickettsiales</i> PCR.....	46
Tab. 11: Protokoll des Thermocyclers für die Borrelien PCR	47
Tab. 12: Liste der im RLB verwendeten Sonden	50
Tab. 13: Ansatz des Mastermixes einer PCR Reaktion für eine anschließende Sequenzierung	55
Tab. 14: "MSP5" Protokoll des Thermocyclers zur Amplifizierung des MSP5 Gens der Anaplasmen	56
Tab. 15: Ansatz eines Mastermixes für eine PCR Reaktion zur Amplifizierung des 16S-rRNS Gens der Anaplasmen.....	57

Tab. 16: "16S Gen AnaEhrl" Protokoll des Thermocyclers für die PCR des 16S-rRNS Gens der Anaplasmen	57
Tab. 17: "GroEL" Protokoll des Thermocyclers zur Amplifizierung des GroEL Gens der Anaplasmen	58
Tab. 18: Liste der verwendeten Geräte	60
Tab. 19: Liste der verwendeten Laborkits.....	61
Tab. 20: Liste der verwendeten DNS Polymerasen	61
Tab. 21: Liste der verwendeten Marker	62
Tab. 22: Liste der verwendeten Chemikalien.....	62
Tab. 23: Liste der Verbrauchsmaterialien	64
Tab. 24: Liste der verwedeten Software.....	65
Tab. 25: Anzahl der gesammelten Zecken aus der Vegetation mit Fundort und Geschlecht.....	70
Tab. 26: Ergebnisse der RLB Untersuchung von 310 adulten Zecken aus der Vegetation	71
Tab. 27: Anzahl der gesammelten Zecken von Rindern mit Fundort und Geschlecht.....	73
Tab. 28: Anzahl der untersuchten Nager und die Anzahl der auf diesen gefundenen Zeckenlarven mit Fundort	74
Tab. 29: Ergebnisse der RLB Untersuchung von 28 gepoolten Proben aus 197 Zeckenlarven.....	75
Tab. 30: Ergebnisse der RLB Untersuchung der Blutproben der Rinder.....	78
Tab. 31: Liste der für die phylogenetische Analyse verwendeten Anaplasmatataceae mit GenBank accession numbers	81
Tab. 32: Untersuchte Herden.....	120
Tab. 33: Liste der gefangenen Nager, die auf juvenile Zeckenstadien untersucht wurden mit Fundort und Anzahl abgesammelter Zeckenlarven sowie deren Zustand.....	124

1 Einleitung

Die Nutztierhaltung erleidet weltweit erhebliche wirtschaftliche Verluste durch Zecken und die von ihnen übertragenen Krankheitserreger. Sie können sowohl zu Lederschäden als auch zu Erkrankungen mit einhergehender Leistungsminderung oder sogar zum Tod der befallenen Tiere führen. Vor einigen Jahren wurde das Vorkommen von *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Theileria orientalis* sowie *Anaplasma marginale* in mongolischen Rindern und im Falle von *Theileria orientalis* auch in Zecken der Art *Dermacentor nuttalli* im Rahmen von PCR Untersuchungen publiziert. Soweit bekannt, stammten alle untersuchten Proben aus den Aimags Khentii, Uvs und Uvurkhangai (AbouLaila *et al.* 2010; Altangerel *et al.* 2011; Altangerel *et al.* 2012; Sivakumar *et al.* 2012; Ybanez *et al.* 2013). Der Nachweis dieser eher in tropischen Regionen vorkommenden und wirtschaftlich bedeutsamen Krankheitserreger des Rindes in der Mongolei war insofern ungewöhnlich, da in dem Land nach momentanem Wissensstand keine der beschriebenen Vektorzeckenarten vorkommen, wobei vor allem auf die in tropischen Regionen vorkommenden Hauptvektoren der Zeckengattung *Rhipicephalus* der Fokus gelegt wurde. Ziel der Arbeit war es daher zu untersuchen, ob sich eine bekannte Vektorzeckenart bis in die Mongolei ausgebreitet hat oder ob die Erreger auch in lokalen Zeckenarten auftreten, welche so als neue Vektoren in Frage kommen könnten. Außerdem sollte der Rinderbestand in dem Aimag Khentii, in dem die Erreger bereits mittels PCR nachgewiesen wurden, auf das Vorkommen dieser und weiterer möglicher Pathogene untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Vollblutproben von Rindern, adulte Zecken von denselben Rindern und aus der Vegetation und zudem juvenile Zeckenstadien von Nagern gesammelt. Die adulten Zecken wurden mittels eines geeigneten Identifikationsschlüssels morphologisch einer Art zugeordnet, die Art der juvenilen Zecken wurde hingegen genetisch ermittelt. Das Blut der Rinder und ausgewählte Zecken wurden auf Krankheitserreger untersucht.

2 Literaturübersicht

Es wird zunächst auf die Biologie und Bedeutung der Zecken und der durch sie bei Rindern übertragbaren Krankheitserreger eingegangen. Daraufhin erfolgt eine kurze Darstellung der Mongolei und der in der Mongolei vorkommenden Zeckenarten. Abschließend wird ein Überblick über die bereits in der Mongolei nachgewiesenen zeckenassoziierten Pathogene gegeben und die Zielsetzung dieser Studie erläutert.

2.1 Die Biologie und Bedeutung der Zecken

Systematik

Zecken sind weltweit vorkommende obligat blutsaugende Arthropoden. Sie befallen Säugetiere, Amphibien, Reptilien und Vögel tropischer bis arktischer Regionen (de la Fuente 2003). Zecken sind den Menschen seit langer Zeit als Plage bekannt. Bereits Homer (ca. 850 v. Chr.) erwähnte den Zeckenbefall an Odysseus Hund und auch eine ägyptische Papyrusrolle, die aus der Zeit um 1500 v. Chr. stammt, berichtete damals vom "Zeckenfieber" (de la Fuente 2003).

Zecken (*Ixodida*) lassen sich wie in Tab. 1 dargestellt systematisch in den Stamm der *Arthropoda* mit dem Unterstamm *Chelicerata* und dort in die Unterklasse der *Acari* mit der Überordnung *Parasitiformes* einordnen (Parola und Raoult 2001; Sonenshine und Roe 2014).

Tab. 1: Systematische Einordnung der Zecken (*Ixodida*)

Stamm	<i>Arthropoda</i> (Gliederfüßer)
Unterstamm	<i>Chelicerata</i> (Kieferklauenträger)
Klasse	<i>Arachnida</i> (Spinnentiere)
Unterklasse	<i>Acari</i> (Milben im weiteren Sinne)
Überordnung	<i>Parasitiformes</i> (parasitäre Milben)
Ordnung	<i>Ixodida</i> (Zecken/Metastigmata)

Es gibt momentan weltweit ca. 896 bekannte Zeckenarten, die sich in 3 Familien einteilen lassen. Die erste Familie ist die der *Argasidae*, welche auch "Lederzecken" oder "soft ticks"

(Engl.) genannt werden. Zu dieser Familie zählen ca. 193 Arten. Die *Nuttalliellidae* sind insofern eine Besonderheit, als dass allein die Art *Nuttalliella namaqua* dieser zweiten Familie zugeordnet wird. Die größte Familie ist die der *Ixodidae*, welche auch als "Schildzecken" oder "hard ticks" (Engl.) bezeichnet werden. Zu ihr gehören 14 Genera mit ca. 702 Zeckenarten (Guglielmone *et al.* 2010).

Im weiteren Verlauf steht die Familie der *Ixodidae* mit den wichtigsten Genera *Amblyomma*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Dermacentor*, *Ixodes* und *Rhipicephalus* im Mittelpunkt. Zeckenbefall durch diese Arten kann bei den Wirtstieren direkt zu Wunden, die sich infizieren können, reduziertem Wachstum, Verlusten in der Milchproduktion und Aborten führen. Einige Arten können auch durch die Übertragung von Toxinen eine Paralyse der befallenen Tiere zur Folge haben (Sonenshine und Roe 2014).

Während der Blutmahlzeit, durch deren orale Aufnahme oder durch das Einreiben von infiziertem Zeckenkot können Zecken Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen und Helminthen auf ihren Wirt übertragen. Sie sind aufgrund der größten Vielfalt an potentiell übertragbaren Vektorkrankheiten unter den Vektoren eine große Gefahr für die Gesundheit von Menschen und Tiere. So führt der Zeckenbefall der Nutztiere weltweit zu großen wirtschaftlichen Verlusten (Bishop *et al.* 2004; Jongejan und Uilenberg 2004; Baneth *et al.* 2007; Baneth 2014; Sonenshine und Roe 2014).

Entwicklung der Schildzecken

Die Entwicklung der Schildzecken läuft über 4 Stadien. Aus den Eiern, welche die weiblichen Zecken legen, schlüpfen Larven, die sich über Nymphen zu adulten Zecken entwickeln. Man unterscheidet zwischen der Anzahl der Wirte und somit auch der Blutmahlzeiten, die eine Zeckenart braucht, um den gesamten Entwicklungszyklus zu durchlaufen, zwischen 1-, 2-, und 3-wirtigen Arten (Sonenshine und Roe 2014). Manche Zeckenarten befallen nur wenige spezielle Wirtstierarten. Andere sind nicht besonders wirtsspezifisch und können verschiedene Wirte befallen. Häufig benötigen die einzelnen Stadien der Zecken für ihre Blutmahlzeit unterschiedliche Wirte (Parola und Raoult 2001).

Morphologie der Schildzecken

Die Schildzecken besitzen mit dem Capitulum (Kopf) und dem Idiosoma (Körper) nur 2 Segmente.

Das Capitulum besteht aus der Basis capituli und den daran ansetzenden Cheliceren, Palpen und dem Hypostom. Die Chelizeren dienen der Zecke als Schneidewerkzeuge, um die Haut des Wirtes aufzuschlitzen. Die Palpen sind als Tastorgane für die Orientierung der Zecke wichtig und das Hypostom mit seinen Zahnreihen findet als Stech- und Saugwerkzeug Verwendung. Das Idiosoma gliedert sich wiederum in zwei Teile. Der vordere ist das Podosoma, in dem die Genitalöffnung liegt und an dem die Beine ansetzen. Die Schildzeckenlarven besitzen drei Beinpaare, alle darauffolgenden Stadien vier. In dem Opisthosoma, dem hinteren Teil, befinden sich die Spiraculi (Atemöffnungen) und die Analöffnung. Die sechsgliedrigen Beine sind über Coxae mit dem Körper verbunden. An dem Tarsus des ersten Beinpaars befindet sich das Haller'sche Organ, das den Zecken als wichtiges Sinnesorgan dient. Namensgebend für die Familie der Schildzecken ist das Scutum, ein sklerosiertes Rückenschild, das alle Mitglieder dieser Familie besitzen. Das Scutum bedeckt bei den adulten männlichen Zecken den gesamten Rücken (Alloscutum), bei den Larven, Nymphen und adulten Weibchen nur die vordere Hälfte (Parola und Raoult 2001; Sonenshine und Roe 2014).

2.2 Durch Zecken übertragbare Krankheitserreger

2.2.1 Babesien

Babesien sind Protozoen, die zur Ordnung der *Piroplasmida* im Stamm der *Apicomplexa* gehören. Sie sind intraerythrozytäre Parasiten, deren Wirte eine Vielzahl von Wirbeltieren sowie ixodide Zecken darstellen. Babesien sind obligat heteroxen, da sie im Rahmen ihres Entwicklungszyklus sowohl auf ein Wirbeltier als Wirt als auch auf eine ixodide Zecke als Vektor angewiesen sind (Homer *et al.* 2000). Jede *Babesien* sp. hat bestimmte Zeckenarten als Vektor, weshalb das Auftreten der *Babesia* spp. in einer Region an die Präsenz ihrer Vektorzeckenarten gekoppelt ist (Homer *et al.* 2000).

Babesien wurden erstmals im Jahr 1888 durch den rumänischen Tierarzt Viktor Babes bei einem erkrankten Rind beschrieben (Babes 1888). Kurze Zeit später wurden die von Babes gefundenen Erreger *Pyrosoma* genannt. Die Zecke *Boophilus annulatus* (heute: *Rhipicephalus annulatus*) (Murrell und Barker 2003; Guglielmone *et al.* 2010) wurde in diesem Zusammenhang als Überträger des Texasfiebers identifiziert (Smith und Kilborne 1893). Starcovici prägte wenig später den Begriff Babesien um Babes als ihren Entdecker zu würdigen

(Starcovici 1893). Im Verlauf der Zeit wurden den Babesien weitere Namen gegeben. Der Begriff Piroplasmen, welcher sich von dem lateinischen Wort „pirum“ (Birne) ableitet und sich auf die unter dem Mikroskop sichtbaren birnenförmigen Merozoiten der Babesien in den befallenen Erythrozyten bezieht, findet bis heute noch Verwendung (Uilenberg 2006). Die Babesien haben insofern historische Bedeutung erlangt, als dass sie die ersten nachweislich durch Arthropoden auf Wirbeltiere übertragbaren Erreger darstellen (Assadian und Stanek 2002).

Bis jetzt wurden über 100 verschiedene Babesienarten beschrieben, die Vögel, Haustiere, Wildtiere und den Menschen infizieren können (Homer *et al.* 2000; Hunfeld *et al.* 2008; Mosqueda *et al.* 2012). Beim Menschen wurde zum ersten Mal 1956 im damaligen Jugoslawien eine Infektion mit einer *Babesia* sp. bei einem splenektomierten Menschen diagnostiziert (Skrabalo und Deanovic 1957). Inzwischen hat man eine Reihe von Babesien gefunden, die zu einer humanen Babesiose führen können. Zu ihnen zählen *Babesia microti*, *Babesia venatorum*, *Babesia divergens*, *Babesia duncani*, *Babesia* sp. CA1, CA3, CA4, *Babesia divergens*-like, *Babesia* sp. (ovine), *Babesia* sp. XXB/HangZhou (Schnittger *et al.* 2012; Man *et al.* 2016).

Babesien können morphologisch in kleine Babesien, deren Merozoiten im Blutausschlag eine Größe von 1-2,5 µm aufweisen, und in große Babesien, die im Blutausschlag 2,5-5 µm groß sein können, eingeteilt werden. Die phylogenetische Einordnung, die auf der 18S-rDNA basiert, entspricht weitestgehend der morphologischen Einteilung. Bei akuten Infektionen mit *Babesia* spp. zeigen die betroffenen Tiere Fieber, Anämie, Hämoglobinurie, Ikterus, Unwohlsein, Lethargie und Anorexie. Chronische Infektionen verlaufen in der Regel asymptomatisch (Schnittger *et al.* 2012).

Der Entwicklungszyklus der *Babesia* spp. setzt sich aus 3 Teilen zusammen. Er beginnt mit der sexuellen Vermehrung (Gamogonie) im Zeckendarm. Der zweite Schritt ist die asexuelle Vermehrung (Sporogonie) in den Speicheldrüsen der Zecke. Zuletzt findet erneut eine asexuelle Vermehrung (Merogonie) im Wirt statt (Homer *et al.* 2000).

Männliche und weibliche Gamonten ("Strahlenkörper") fusionieren im Darmlumen der Zecke. Die daraus entstehenden Zygoten entwickeln sich zu Kineten weiter und dringen in die Darmzellen der Zecke ein. Dort bilden sich nach einer Vermehrungsphase Sporokineten (Homer *et al.* 2000). Diese können über die Hämolymphe weitere Körperzellen der Zecke befallen. In den unterschiedlichen Körperzellen können sie weitere dieser Sporogoniezyklen

durchlaufen. Gelangen die Sporokineten in die Speicheldrüse der Zecke, entstehen aus den Sporokineten eine Vielzahl von Sporozoiten. Letztere können während der Blutmahlzeit der Zecke auf deren Wirt übertragen werden (vertikale Übertragung) (Mehlhorn und Schein 1984). Infizieren die Sporokineten die Ovarien und die dort befindlichen Eier der weiblichen Zecke, können die entstehenden juvenilen Zeckenstadien ebenfalls infiziert sein (transovarielle Übertragung) (Uilenberg 2006). Im Säugetierwirt dringen die Sporozoiten bei den meisten Babesienarten in die Erythrozyten ein und teilen sich dort in der Regel in zwei, selten auch mehr Tochterzellen. Anschließend verlassen die Merozoiten die Erythrozyten und können weitere Erythrozyten befallen (Schnittger *et al.* 2012). Während der Blutmahlzeit der Zecke können die Merozoiten wieder in den Zeckendarm gelangen, wo sie sich erneut zu Gamonten weiterentwickeln (Uilenberg 2006).

Die ökonomisch bedeutsamsten *Babesia* spp. des Rindes sind *B. bigemina*, *B. bovis* und *B. divergens* (Schnittger *et al.* 2012). Außer diesen kommen noch weitere Arten bei Rindern vor (siehe Tab. 2). In der Rinderhaltung führen eine erhöhte Mortalität, Aborte, verringerte Fleisch- und Milchproduktion, Kontrollmaßnahmen, Einschränkungen der möglichen Produktion und Handelseinschränkungen zu den entstehenden Kosten einer Infektion mit Babesien, die als "Bovine Babesiose" oder "red water fever" bezeichnet wird (Schnittger *et al.* 2012).

Kälber haben die ersten 2 Lebensmonate eine passive Immunität gegen eine Infektion mit Babesien, wenn sie Antikörper der Mutter über das Kolostrum aufnehmen. Im Anschluss folgt eine angeborene Immunität vom 3. bis zum 9. Lebensmonat. Nach einer Infektion im Zeitraum zwischen dem 6. und 9. Lebensmonat zeigen die Kälber nur leichte Symptome und entwickeln nach überstandener Infektion eine lange Immunität. Dies kann zu einer endemischen Stabilität im Rinderbestand führen, da die Kälber nach überstandener Infektion persistent infiziert bleiben und so als Reservoir dienen (Bock *et al.* 2004).

Babesia bovis hat eine Präpatenz von 6-12 Tagen mit einem Höhepunkt der Parasitämie 3-5 Tage später. *Babesia bigemina* weist in der Regel eine längere Präpatenzzeit von normalerweise 12-18 Tagen auf, die aber auch auf 6-12 Tagen verkürzt sein kann (Bock *et al.* 2004).

Bos indicus zeigt weniger klinische Symptome einer Infektion mit Babesien als *Bos taurus*, weshalb eine größere Resistenz von *Bos indicus* gegen Babesien angenommen werden kann (Bock *et al.* 1999).

Für *B. bovis* sind die in tropischen Regionen vorkommenden Zeckenarten *Rhipicephalus microplus*, *Rh. annulatus* und *Rh. geigy* als Vektoren bekannt. Für *B. bigemina* sind zudem die Zeckenarten *Rh. decoloratus* und *Rh. evertsi* als Vektorzecken beschrieben (Tab. 2).

Tab. 2: Babesienarten des Rindes, ihre ixodiden Hauptvektoren und ihre bekannte Verbreitung nach Bock *et al.* (2004), Uilenberg (2006) und Schnittger *et al.* (2012)

<i>Babesia</i> spp.	Ixodide Hauptvektoren	Wirte	Erkrankung	Verbreitung
<i>Babesia bigemina</i>	<i>Rh. microplus</i> <i>Rh. decoloratus</i> <i>Rh. annulatus</i> <i>Rh. geigy</i> <i>Rh. evertsi</i>	Rinder, Wasserbüffel	Bovine Babesiose	Afrika, Asien, Australien, Zentral- und Südamerika und Südeuropa
<i>Babesia bovis</i>	<i>Rh. microplus</i> <i>Rh. annulatus</i> <i>Rh. geigy</i>	Rinder, Wasserbüffel	Bovine Babesiose	Wie für <i>Babesia bigemina</i> , aber in Africa weniger weit verbreitet
<i>Babesia divergens</i>	<i>I. ricinus</i> <i>I. persulcatus</i>	Rinder	Bovine Babesiose	Nordwesteuropa, Spanien, Großbritannien, Irland
<i>Babesia major</i>	<i>Hae. punctata</i>	Rinder	Bovine Babesiose	Europa, Nordwest Afrika, Asien
<i>Babesia ovata</i>	<i>Hae. longicornis</i>	Rinder	Bovine Babesiose	Ostasien
<i>Babesia jackimovi</i>	Ixodes?	Rinder	Bovine Babesiose	Sibirien
<i>Babesia beliceri</i>	Hyalomma	Rinder	Bovine Babesiose	Russland
<i>Babesia</i> sp. <i>Kashi</i>	?	Rinder	Bovine Babesiose	China

2.2.2 Theilerien

Theilerien sind Protozoen, die zur Ordnung der *Piroplasmida* im Stamm der *Apicomplexa* gehören. Ihr Entwicklungszyklus ähnelt dem der Babesien. Der Unterschied liegt darin, dass die Sporozoiten der Theilerien im Gegensatz zu denen der Babesien im Wirt zuerst Lymphozyten oder Makrophagen und keine Erythrozyten befallen (Uilenberg 2006). In dem Entwicklungsschritt, der auf den Befall der Leukozyten folgt, unterscheiden sich die Theilerien darüber hinaus untereinander und werden in 2 Gruppen eingeteilt. Haben die Theilerien die Fähigkeit die befallenen Leukozyten zur unbegrenzten Teilung anzuregen, gehören diese Theilerien zu den "transforming" Arten. Besitzen sie die beschriebene Fähigkeit nicht, werden sie den "non transforming" Arten zugeordnet (Sivakumar *et al.* 2014). Nachdem aus den Schizonten, die sich in den Leukozyten bilden, Merozoiten hervorgegangen sind, befallen letztere die Erythrozyten des Wirtes. Die Kineten, welche aus den Erythrozyten freigesetzt werden, gelangen nach der Blutmahlzeit in den Darm der Zecke, in dem die Gamogonie stattfindet. Es bilden sich Gameten, welche sich zu einer Zygote vereinigen. Diese Zygoten entwickeln sich weiter zu Kineten, welche über die Hämolymphe in die Speicheldrüsen gelangen, in der sich Sporozoiten bilden (Bishop *et al.* 2004; Uilenberg 2006; Mans *et al.* 2015). Überträgt eine infizierte Zecke während einer Blutmahlzeit einmal die Sporozoiten auf den Wirt, ist sie im Anschluss nicht mehr infektiös und die folgenden Parasitenstadien sind frei von dem Erreger (Uilenberg 2006).

Theileria spp. spielen besonders als Parasiten der domestizierten und wilden Wiederkäuer eine Rolle. Es wurden aber auch andere Tierarten, wie die Buschschwanzratte, der Fuchs und das Pferd als Wirte beschrieben und neue Wirte werden weiterhin entdeckt (Bishop *et al.* 2004; Sivakumar *et al.* 2014; Mans *et al.* 2015).

Von 6 Theilerien-Arten weiß man, dass sie Boviden infizieren können (siehe Tab. 3). Die "transforming" Arten *T. annulata*, *T. parva* und *T. taurotragi*, die vor allem in Afrika und erstere auch in Südeuropa vorkommen, verursachen in der Regel deutlich stärkere klinische Symptome als die "non-transforming" und sind daher wirtschaftlich bedeutsamer. Zu den "non-transforming" Arten gehören *T. orientalis*, *T. mutans* und *T. velifera* (Sivakumar *et al.* 2014; Mans *et al.* 2015). *T. sergenti* und *T. buffeli* wurde jüngst der gemeinsame Name *T. orientalis* gegeben. Diese Theilerienart wird hauptsächlich durch *Haemaphysalis* Zecken übertragen und

ist weltweit verbreitet, führt aber vor allem in Neuseeland, Australien und Japan zu wirtschaftlichen Verlusten (Watts *et al.* 2016).

Tab. 3: *Theileria* spp., die Boviden infizieren können, ihre Hauptvektoren und ihr Verbreitungsgebiet nach Bishop *et al.* (2004)

Arten	Hauptvektoren	Erkrankungen	Bekanntes Verbreitungsgebiet
<i>T. parva</i>	<i>Rh. appendiculatus</i> <i>Rh. zambesiensis</i> <i>Rh. duttoni</i>	Ostküstenfieber	Ost-, Zentral- und Südafrika
<i>T. annulata</i>	<i>H. anatolicum</i> und andere <i>Hyalomma</i> spp.	Mittelmeertheileriose	Südeuropa, West-, Süd- und Ostasien, Nordafrika
<i>T. mutans</i>	<i>Am. variegatum</i> und andere <i>Amblyomma</i> spp.	Benigne afrikanische Theileriose von Rindern	West-, Ost-, Zentral- und Südafrika, Karibische Inseln
<i>T. velifera</i>	<i>Am. variegatum</i> und andere <i>Amblyomma</i> spp.	Benigne bovine Theileriose	West-, Ost-, Zentral- und Südafrika
<i>T. taurotragi</i>	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> <i>Rh. zambesiensis</i> <i>Rh. pulchellus</i>	Benigne bovine Theileriose	Ost-, Zentral- und Südafrika
<i>T. orientalis</i> (Synonym: <i>T. buffeli</i> oder <i>T. sergenti</i>)	<i>Haemaphysalis</i> spp.	Benigne bovine Theileriose	Europa, Asien, Australien, Ostafrika

2.2.3 Anaplasmen

Anaplasmen gehören in die Ordnung der *Rickettsiales* in der Klasse der α -Proteobakterien. In der Familie der *Anaplasmataceae* sind die Anaplasmen eines von vier Genera neben *Ehrlichia*, *Neorickettsia* und *Wolbachia* (Dumler *et al.* 2001). *Anaplasma* spp. sind obligat intrazellulär lebende gramnegative Bakterien, die in Vakuolen von Zellen eukaryotischer Wirte parasitieren (Rymaszewska und Grenda 2008). Je nach Anaplasmenart werden Erythrozyten, Monozyten, Granulozyten oder Thrombozyten befallen (Rymaszewska und Grenda 2008). Die Erreger werden entweder auf biologischem Weg durch Zecken oder mechanisch übertragen. 12 Stechfliegenarten der Genera *Tabanus* und *Stomoxys* konnten experimentell als Vektoren einer mechanischen Übertragung identifiziert werden (Aubry und Geale 2011). Weiterhin zählen Moskitos und mit Blut kontaminiertes medizinisches Werkzeug zu den weiteren möglichen Übertragungswegen (Kocan *et al.* 2003; Kocan *et al.* 2015). Veterinär- oder humanmedizinisch relevant sind *A. marginale*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. ovis*, *A. platys* und *A. phagocytophilum* (Rymaszewska und Grenda 2008).

A. marginale ist der Erreger der Bovinen Anaplasmosen. Die Erkrankung tritt weltweit in tropischen und subtropischen Regionen (~40°N - 32°S) in Süd- und Zentralamerika, den USA, Südeuropa, Afrika, Asien und Australien auf und führt in den betroffenen Ländern zu enormen wirtschaftlichen Verlusten (Aubry und Geale 2011; Kocan *et al.* 2015).

Die folgenden Zeckenarten wurden als potentielle Vektoren beschrieben: *Rhipicephalus annulatus*, *Rh. calcaratus*, *Rh. decoloratus*, *Rh. microplus*, *Rh. bursa*, *Rh. evertsi*, *Rh. sanguineus*, *Rh. simus*, *Dermacentor albipictus*, *D. andersoni*, *D. hunteri*, *D. occidentalis*, *D. reticulatus*, *D. variabilis*, *Hyalomma rufipes*, *Ixodes ricinus*, *I. scapularis* (Kocan *et al.* 2004; Zivkovic *et al.* 2007).

A. marginale führt vor allem bei Rindern zu klinischen Symptomen. Bei Wasserbüffeln, Bisons, afrikanischen Antilopen und einigen Hirscharten konnten persistierende Infektionen nachgewiesen werden (Aubry und Geale 2011). Anämie und Ikterus ohne Hämoglobinurie, Fieber, Gewichtsverlust, Aborte, Lethargie und Todesfälle können klinisch bei einer Infektion mit dem Erreger beobachtet werden (Kocan *et al.* 2003). Das Auftreten der klinischen Symptomatik ist jedoch altersabhängig. Bei Rindern über 2 Jahren verläuft die Erkrankung nach Aubry und Geale (2011) in der Regel akut mit stark ausgeprägter Symptomatik und endet in 29 %-49 % der Fälle tödlich, wohingegen jüngere Rinder kaum Symptome zeigen. Nach überstandener Infektion bildet sich eine lebenslange Immunität aus, hierbei persistiert die

Infektion mit *A. marginale* in den Rindern, welche damit als Reservoir dienen. Eine Vielzahl an Stämmen von *A. marginale* wurde inzwischen beschrieben und gezeigt, dass Rinder von mehreren dieser Stämme gleichzeitig infiziert sein können (Palmer *et al.* 2004; Kocan *et al.* 2015).

Ehrlichia equi, *Ehrlichia phagocytophila* und der Erreger der Humanen granulozytären Ehrlichiose wurden zu dem Bakterium *A. phagocytophilum* zusammengefasst (Dumler *et al.* 2001). Die Vektoren von *A. phagocytophilum* sind Zecken des *Ixodes persulcatus* Komplexes, die hauptsächlich in der nördlichen Hemisphäre zu finden sind. Vor allem *Ixodes ricinus* und *Ixodes scapularis* spielen bei der Übertragung eine Rolle. Es werden aber auch weitere Zecken wie *I. persulcatus*, *I. trianguliceps*, *I. spinipalpis*, *I. pacificus* und *Haemaphysalis punctata* als Vektoren vermutet (Woldehiwet 2010).

2.2.4 Ehrlichien

Ehrlichien gehören in der Ordnung der *Rickettsiales* in die Familie der *Anaplasmatacea*. *Ehrlichia spp.* sind obligat intrazellulär lebende gramnegative Bakterien, die in Vakuolen eukaryotischer Zellen leben. (Dumler *et al.* 2001). Veterinärmedizinisch sind besonders *Ehrlichia ruminantium* und *Ehrlichia canis* relevant.

Ehrlichia ruminantium ist der Erreger der "Heartwater disease" oder auch "Cowdriose" genannten Erkrankung von Rindern, Schafen, Ziegen und einigen afrikanischen Wildtieren. Die Erkrankung kommt in Afrika und auf einigen karibischen Inseln vor (Peter *et al.* 2002; Allsopp 2010; Allsopp 2015). Überträger der Ehrlichien sind Zecken der Gattung *Amblyomma*, wobei in Afrika *Am. hebraeum*, *Am. variegatum*, *Am. pomposum*, *Am. gemma*, *Am. lepidum*, *Am. tolloni*, *Am. sparsum*, *Am. astrion*, *Am. cohaerens*, *Am. marmoreum* und in der Karibik *Am. variegatum*, *Am. maculatum* und *Am. cajennense* die Vektorfunktion ausüben (Bezuidenhout 1987; Walker 1987; Mahan *et al.* 2000).

Ehrlichia canis, *Ehrlichia chaffeensis* und *Ehrlichia ewingii* sind die Erreger der caninen Ehrlichiose, wobei *E. chaffeensis* und *E. ewingii* vor allem humanmedizinische Relevanz besitzen (Little 2010). *Rhipicephalus sanguineus* ist der Hauptvektor von *Ehrlichia canis* (Groves *et al.* 1975; Fourie *et al.* 2013). Weitere Vektoren der *Ehrlichia spp.* des Hundes sind *Amblyomma americanum* und *Dermacentor variabilis* (Little 2010). Letztere wurde

experimentell als Vektor von *Ehrlichia canis* ermittelt (Johnson *et al.* 1998). *E. canis* tritt weltweit (Afrika, Asien, Europa und Amerika) vor allem in subtropischen und mediterranen Regionen auf, in denen auch die Vektorzeckenarten präsent sind (Fourie *et al.* 2013).

2.2.5 Rickettsien

Die bis heute beschriebenen 26 *Rickettsia* spp. gehören zur Ordnung der *Rickettsiales* in der Familie der *Rickettsiaceae* und sind weltweit verbreitet (Parola *et al.* 2013). Rickettsien sind gramnegative, obligat intrazellulär lebende Bakterien (Socolovschi *et al.* 2009). Klinisch bedeutsam sind die zur spotted fever group (SFG) gehörenden Rickettsien, die in ihrem Lebenszyklus auf Arthropoden und hierbei vor allem auf Zecken angewiesen sind (Parola *et al.* 2005). Die Erkrankung durch Rickettsien gehört zu den ältesten bekannten durch einen Vektor übertragbaren Erkrankungen (Parola *et al.* 2005).

Rickettsia raoultii wurde das erste Mal in Verbindung mit *Dermacentor* Zecken in Europa und Russland beschrieben (Mediannikov *et al.* 2008). Bisher wurde nur beim Menschen von milden Symptomen im Rahmen einer Infektion mit *R. raoultii* berichtet (Angelakis *et al.* 2010; Parola *et al.* 2013). In Rindern wurde *R. raoultii* bisher noch nicht nachgewiesen.

2.2.6 Borrelien

Borrelien gehören in die Familie der Spirochaetaceae. Sie sind spiralförmige Bakterien, die von Zecken übertragen werden können (Brisson *et al.* 2012). Willi Burgdorfer beschrieb zum ersten Mal 1984 ein Bakterium, welches später nach ihm *Borrelia burgdorferi* benannt wurde, als den Erreger der Lyme Borreliose beim Menschen (Burgdorfer *et al.* 1982). Die Lyme Borreliose wurde nach der Stadt Lyme in Connecticut benannt, in der der Erreger zum ersten Mal beschrieben wurde (Steere *et al.* 1977). Inzwischen sind über 18 verschiedene *Borrelia* Arten, die durch *Ixodes* Zecken übertragen werden, entdeckt worden (Cook 2015). Tab. 4 zeigt die bekannten *Borrelia* spp. mit ihren Vektoren, Wirten und ihrer geographischen Verbreitung.

Borrelia afzelii, *Bor. garinii* und *Bor. burgdorferi* s.s. gehören zu den Haupterregern der Lyme Borreliose des Menschen (Brisson *et al.* 2012). *Borrelia miyamotoi* ist eine weitere ebenfalls für den Menschen pathogene Borrelienart, die in Japan entdeckt wurde, aber auch in Europa vorkommt. Dieses Bakterium gehört phylogenetisch eher zur Gruppe der Rückfallfieber-

Erreger, wird jedoch von Ixodes Zecken übertragen (Fukunaga *et al.* 1995; Cook 2015; Wagemakers *et al.* 2015). *Borrelia bavariensis* und *Borrelia spielmanii* sollen in Europa ebenfalls zu klinischen Symptomen bei Menschen führen (Stanek *et al.* 2012). Bei den weiteren Arten *Borrelia bissettii*, *Borrelia kurtenbachii*, *Borrelia lusitaniae* und *Borrelia valaisiana* ist die Pathogenität für den Menschen noch nicht gänzlich geklärt (Cook 2015).

Es ist bereits bekannt, dass in der Mongolei *Borrelia* spp. vorkommen (Walder *et al.* 2006; Margos *et al.* 2013).

Hunde scheinen unter den Haustieren am anfälligsten für die Erkrankung mit einer Lyme Borreliose zu sein. Sie können klinische Symptome wie Fieber, generelles Unwohlsein, Lymphknotenschwellung, Polyarthritits und chronische Formen der Neuroborreliose entwickeln. Bis jetzt wurde jedoch noch keine natürliche Infektion einer Katze mit Lyme Borreliose beschrieben (Krupka und Straubinger 2010; Chomel 2015). In Rindern konnte bisher nur in wenigen klinischen Verdachtsfällen die Krankheitsursache in einer Infektion mit *Borrelia* spp. vermutet werden (Burgess *et al.* 1987; Wells *et al.* 1993; Murray *et al.* 2002; Stefancikova *et al.* 2002). Experimentelle Infektionen von Rindern mit *Borrelia* spp. führten zu keinen klinischen Symptomen. jedoch konnte eine Serokonversion beobachtet werden. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist mit einer relativ geringen Empfänglichkeit von Rindern für eine klinisch manifeste Lyme Borreliose zu rechnen (Tuomi *et al.* 1998).

Tab. 4: Aktuell bekannte Arten des *Borrelia burgdorferi sensu lato* Komplexes nach Rudenko *et al.* (2011)

<i>Borrelia</i> spp.	Vektor	Wirt/Reservoir	Geographische Verbreitung
<i>Bor. afzelii</i>	<i>I. ricinus, I. persulcatus</i>	Nager	Asien, Europa
<i>Bor. americana</i>	<i>I. pacificus, I. minor</i>	Vögel	USA
<i>Bor. andersonii</i>	<i>I. dentatus</i>	Baumwollschwanzkaninchen	USA
<i>Bor. bavariensis</i>	<i>I. ricinus</i>	Nager	Europa ¹
<i>Bor. bissettii</i>	<i>I. ricinus, I. scapularis,</i> <i>I. pacificus, I. minor</i>	Nager	Europa, USA
<i>Bor. burgdorferi sensu stricto</i>	<i>I. ricinus, I. scapularis,</i> <i>I. pacificus</i>	Nager, Vögel, Eidechsen, große Säugetiere	Europa, USA
<i>Bor. californiensis</i>	<i>I. pacificus, I. jellisonii,</i> <i>I. spinipalpis</i>	Kangururatte, Maultierhirsch	USA
<i>Bor. carolinensis</i>	<i>I. minor</i>	Nager, Vögel	USA
<i>Bor. garinii</i>	<i>I. ricinus, I. persulcatus,</i> <i>I. hexagonus, I. nipponensis</i>	Vögel, Eidechsen, Nager	Asien, Europa
<i>Bor. japonica</i>	<i>I. ovatus</i>	Nager	Japan
<i>Bor. kurtenbachii</i>	<i>I. scapularis</i>	Nager	Europa, USA
<i>Bor. lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i>	Nager, Eidechsen	Europa, Nordafrika
<i>Bor. sinica</i>	<i>I. ovatus</i>	Nager	China
<i>Bor. tanukii</i>	<i>I. tanuci</i>	Unbekannt (möglicherweise Hunde und Katzen)	Japan

Literaturübersicht

<i>Borrelia</i> spp.	Vektor	Wirt/Reservoir	Geographische Verbreitung
<i>Bor. turdi</i>	<i>I. turdus</i>	Vögel	Japan
<i>Bor. spielmanii</i>	<i>I. ricinus</i>	Nager	Europa
<i>Bor. valaisiana</i>	<i>I. ricinus, I. granulatus</i>	Vögel, Eidechsen	Asien, Europa
<i>Bor. yangtzensis</i>	<i>Haempaphysalis longicornis,</i> <i>I. granulatus</i>	Nager	China
Genomospezies 2	<i>I. pacificus</i>	Unbekannt	USA

¹ *Bor. bavariensis* ähnliche Stämme wurden inzwischen auch in der Mongolei nachgewiesen (Scholz *et al.* 2013)

2.3 Diagnostische Methoden zum Nachweis von durch Zecken übertragbaren Erregern

Krankheitserreger, die von Zecken übertragen werden, können in den Wirtstieren mittels verschiedener Methoden diagnostiziert werden. Wenn die Erreger direkt sichtbar gemacht oder bestimmte Zielgene derselben nachgewiesen werden, spricht man von direkten Methoden. Wird jedoch nur die immunologische Antwort des Wirtes auf den Erreger zur Diagnostik verwendet, spricht man von indirekten Methoden.

Eine Diagnose von Babesiose kann mittels Mikroskopie in Ausstrichen von Blut, Gehirn, Haemolymph und anderen Organen erfolgen, wobei die Ausstrichpräparate nach dem Ausstreichen zuerst luftgetrocknet, anschließend mit Methanol fixiert und zuletzt nach Giemsa oder einer ähnlichen Färbemethode angefärbt werden (Mosqueda *et al.* 2012). Ein Erregernachweis in Blutausstrichen ist ebenfalls bei der Theileriose, Ehrlichiose und Anaplasmose möglich, wobei die Sensitivität der Methode in der akuten Phase der jeweiligen Infektion am höchsten ist (Little 2010; Aubry und Geale 2011; Harrus und Waner 2011; Mans *et al.* 2015). Zum direkten Erregernachweis von durch Zecken übertragbaren Krankheitserregern wurden darüber hinaus eine Vielzahl an PCR (Polymerase-Chain-Reaction) Protokollen entwickelt, die den Nachweis einer oder mehrerer Pathogene auf Grundlage der Vervielfältigung bestimmter Zielgene ermöglichen (Mosqueda *et al.* 2012; Bilgic *et al.* 2013). Ein spezifischeres direktes diagnostisches Verfahren ist das Reverse Line Blot Hybridisation Assay (RLB), das der PCR nachgeschaltet ist und bei dem hypervariable Regionen bestimmter Zielgene einen spezifischen Nachweis mehrerer Pathogene gleichzeitig erlauben (Gubbels *et al.* 1999; Bekker *et al.* 2002). Mit der Real-Time-PCR (RT-PCR) können ähnlich wie bei der konventionellen PCR spezifische DNS Fragmente amplifiziert und in Echtzeit quantifiziert werden. Eine weitere direkte Nachweismethode von Pathogen-DNS ist die Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP), bei der mehrere Sequenzen einer Ziel-DNS bei isothermalen Bedingungen mit hoher Effizienz, Spezifität und Geschwindigkeit amplifiziert werden (Mosqueda *et al.* 2012).

Zu den indirekten Nachweismethoden von Pathogenen in Tieren gehören unter anderem der Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT), das Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und der Immunochromatographie Test (ICT) (Mosqueda *et al.* 2012).

2.4 Mongolei

2.4.1 Die Mongolei

Die Mongolei liegt in Zentralasien mit Grenzen zu Russland im Norden und China im Süden. Sie ist mit einer Fläche von 1.564.120 km² der zweitgrößte Binnenstaat der Welt und damit ungefähr 4,5 Mal so groß wie Deutschland (Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung 2016; Auswärtiges Amt 2017). Das Land erstreckt sich von 41°32' bis 52°06' nördlicher Breite und von 87°47' bis 119°54' östlicher Länge (Splisteser 2009).

Verwaltungstechnisch ist die Mongolei in 21 Aimags, welche man mit Provinzen gleichsetzen kann, und zusätzlich die Hauptstadt Ulaanbaatar untergliedert (Abb. 1). Die Aimags sind wiederum in Landkreise eingeteilt, die Somone genannt werden.

Die Mongolei hat ca. 3 Mio. Einwohner, von denen ungefähr 1,2 Mio. in Ulaanbaatar leben. Sie ist aufgrund ihrer enormen Größe und der niedrigen Bevölkerungszahl eines der am dünnsten besiedelten Länder der Welt (Auswärtiges Amt 2017).

In der Mongolei herrscht ein streng kontinentales Klima. Die Winter sind sehr kalt und die Sommer sehr warm, sodass eine maximale Temperaturamplitude von fast 100 °C erreicht werden kann, die es in fast keinem anderen Land der Erde gibt. Ulaanbaatar ist mit einer durchschnittlichen Jahrestemperatur von unter 0 °C die kälteste Hauptstadt der Welt. Der kälteste Monat ist der Januar mit durchschnittlich ca. -25 °C. Im Sommer ist der Juli mit durchschnittlichen Temperaturen von ca. 18 °C am wärmsten (Splisteser 2009). Die Wachstumsperiode für Pflanzen ist daher sehr kurz und Ackerbau kaum möglich.

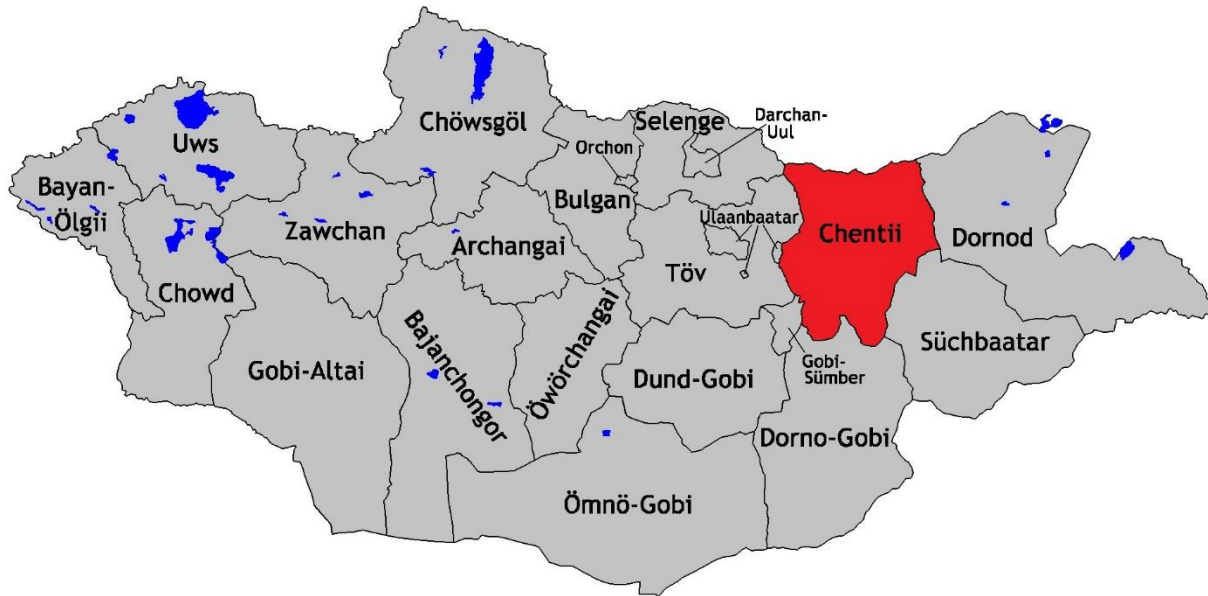


Abb. 1: Aimags der Mongolei modifiziert nach Anonym(a) (2017)

(Das Aimag Khentii, in dem die vorliegende Studie durchgeführt wurde, ist rot hervorgehoben.)

2.4.2 Nutztierhaltung in der Mongolei

Die Mongolen sind traditionell ein Nomadenvolk, welches Pferde, Schafe, Ziegen, Rinder und Kamele hält. Die Nutztierhaltung stellt die traditionelle Basis der mongolischen Ökonomie dar. Ca. 40 % der arbeitsfähigen Bevölkerung arbeiten im Agrarsektor, in erster Linie in der Nutztierhaltung. Der Agrarsektor erwirtschaftet heute ca. 20 % des Bruttoinlandsproduktes der Mongolei. Momentan leben ca. 30 % der Mongolen nomadisch oder halbnomadisch (Batsukh *et al.* 2013).

Im Jahr 2011 wurden in der Mongolei ca. 36 Mio. Nutztiere gehalten. Zahlenmäßig lagen Schafe und Ziegen mit jeweils 16 Mio. Tieren weit an der Spitze. Es folgten Rinder mit einem Bestand von ca. 2,3 Mio. und Pferde mit ca. 2,1 Mio. Tieren. Kamele sind noch mit ca. 280 000 Tieren vertreten. Andere Nutztiere wie Schweine und Rentiere haben zahlenmäßig keine große Bedeutung (Anonym(b) 2012).

Je nach Region müssen die Nomaden mit ihren Tieren unterschiedlich weit wandern, damit die Tiere genug Nahrung bekommen. Dies sind in der Wüstenzone ca. 200 km im Jahr und in der Steppenzone ca. 60 km im Jahr (Splisteser 2009).

2.4.3 Zeckenarten in der Mongolei, deren Verbreitung und Bekämpfung

In der Mongolei wurden 18 verschiedene Zeckenarten beschrieben (Daš *et al.* 1989). Inzwischen wurden einige Zeckenarten umbenannt bzw. anderen Arten zugeordnet (Camicas 1998). Heute wird insgesamt über 13 verschiedene valide Zeckenarten in der Mongolei berichtet (Tab. 5).

Durch die Untersuchungen von Dash (1988) konnte ermittelt werden, dass das Auftreten bestimmter Zeckenarten in der Mongolei nicht nur an natürlich-klimatische Bedingungen, sondern auch an eine bestimmte Art des Pflanzenbewuchses gekoppelt ist. Auf dieser Grundlage konnte eine Karte über die Verbreitung der einzelnen Schildzeckenarten erstellt werden (Abb. 2). Demnach lassen sich die Schildzecken in der Mongolei in faunistische Gruppen einteilen. In Gebieten des Wüstengürtels und der Gobizone ist mit dem Auftreten der Zecken *Rh. pumilio*, *H. asiaticum* und *D. marginatus* zu rechnen. Die zweite Gruppe mit den Mitgliedern *Hae. pospelovaschtroniae* und *H. demindova* kommt in der Gobi-, Steppen- und Waldsteppenzone vor. In den Hochgebirgsgürteln des Hubsugul- und Chenteirückens treten *D. silvarum* und *I. persulactus* als weitere Gruppe auf. Die dominante und am weitesten verbreitete Zeckenart ist *D. nuttalli*.

Eine eingipflige Saisonaktivität mit einer Frühjahrs- oder Sommerspitze ist typisch für die Zecken in der Mongolei. Das genaue zeitliche Auftreten der einzelnen Zecken variiert jedoch nach Art und Region. Der Befallshöhepunkt der Zecken auf Haustieren liegt im mongolischen Altai und in der Steppenzone im April, wogegen in den tiefen Tälern des Wüstengürtels die meisten Zecken auf den Haustieren im Mai und Juni und hier auch länger zu finden sind (Dash 1988).

Tab. 5: Liste der in der Mongolei auftretenden Zeckenarten nach Daš *et al.* (1989)

Genera	Spezies
<i>Ixodinae</i>	<p><i>I. persulcatus</i> (Schulze, 1930)</p> <p><i>I. lividus</i> (Koch, 1844)</p> <p><i>I. laguri</i> (Olenev, 1929)</p> <p>(in (Daš <i>et al.</i> 1989) als <i>Ixodes laguri laguri</i> (Kirshenblat, 1938) bezeichnet)</p> <p><i>I. crenulatus</i> (Koch, 1844)</p> <p><i>I. arboricola</i> (Schulze & Schlottke, 1930)</p> <p>(in (Das, 1989) auch als <i>I. passericola</i> (Schulze, 1933) bezeichnet)</p> <p><i>I. prokophovi</i> (<i>Nomen nudum</i>)</p>
<i>Dermacentor</i>	<p><i>D. nuttalli</i> (Olenev, 1928)</p> <p><i>D. silvarum</i> (Olenev, 1931)</p> <p><i>D. marginatus</i> (Sulzer, 1776)</p> <p>(in (Das, 1989) als <i>D. daghestanicus</i> (Olenev, 1928) bezeichnet (Estrada-Pena und Estrada-Pena 1991))</p> <p><i>D. asiaticum</i> (<i>Nomen nudum</i>)</p>
<i>Haemaphysalis</i>	<p><i>Hae. pospelovaschtroniae</i> (Hoogstraal, 1966)</p> <p><i>Hae. demidova</i> (Emel'yanova, 1978)</p> <p><i>Hae. warburton nuttalli</i> (keine valide Spezies, wahrscheinlich <i>Hae. warburtoni</i> (Nuttall, 1912))</p>
<i>Hyalomma</i>	<p><i>H. asiaticum</i> (Schulze & Schlottke, 1930) – in (Das, 1989) auch als <i>H. asiaticum asiaticum</i> bezeichnet (Apanaskevich und Horak 2010)</p> <p><i>H. dromedarii</i> (Koch, 1844)</p>
<i>Rhipicephalus</i>	<p><i>Rh. pumilio</i> (Schulze, 1935)</p>

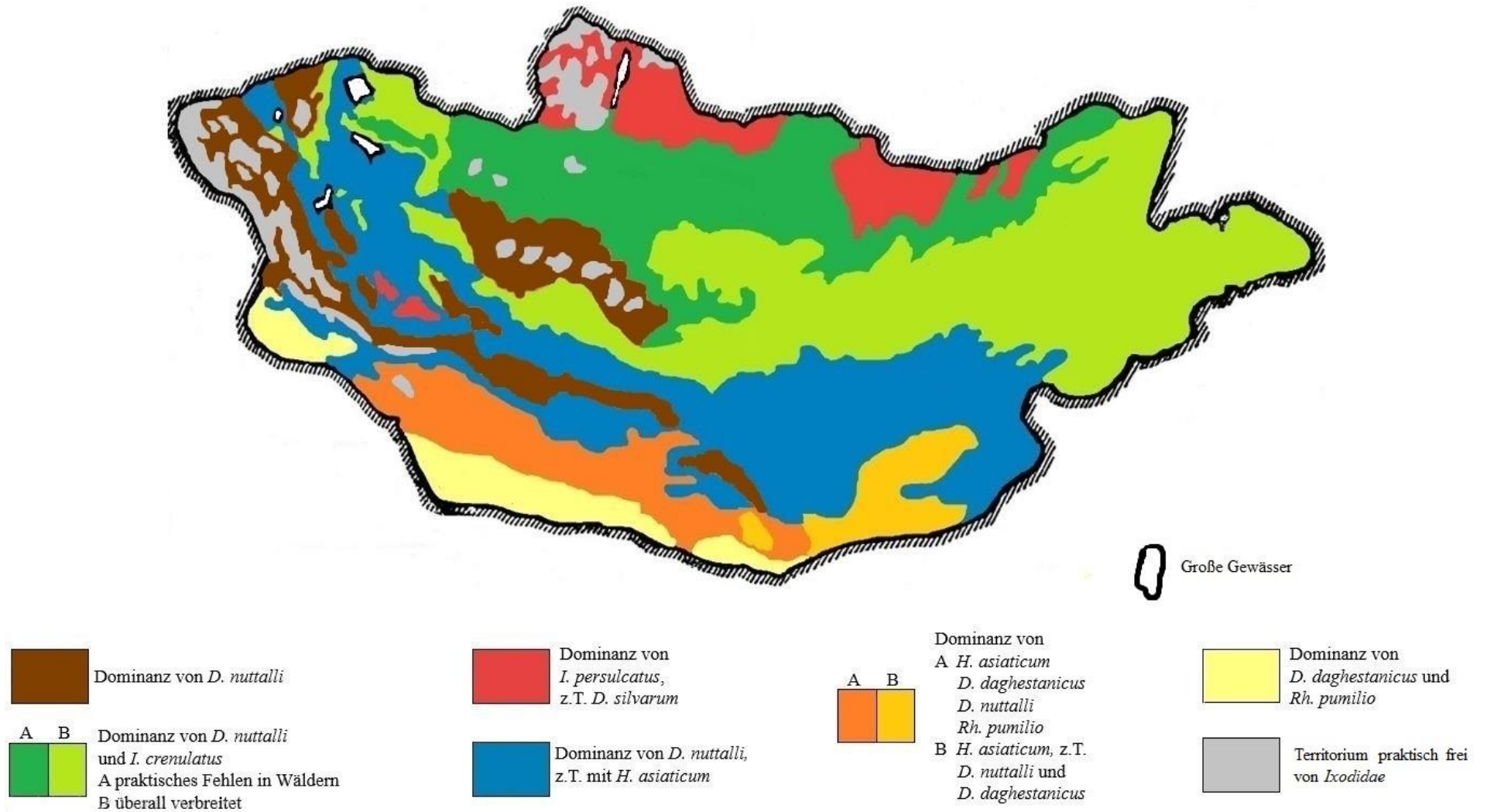


Abb. 2: Verbreitungszonen der in der Mongolei bekannten Zeckenarten nach Dash (1986)

2.4.4 Zeckenassoziierte Krankheitserreger von Nutztieren in der Mongolei

In der Mongolei sind verschiedene zeckenassoziierte Krankheitserreger von Nutztieren beschrieben. So ist bekannt, dass *Babesia caballi* und *B. equi* (Synonym: *Theileria equi*) in der mongolischen Pferdepopulation weit verbreitet sind. Ihre lokal vorkommenden Vektorzecken sind *D. nuttalli*, *D. silvarum* und *H. dromedarii* (Battsetseg *et al.* 2001; Battsetseg *et al.* 2002; Boldbaatar *et al.* 2005; Ruegg *et al.* 2007; Sloboda *et al.* 2011; Scoles und Ueti 2015).

AbouLaila *et al.* (2010) wollten eine neue nPCR für den Nachweis von *Babesia bovis* entwickeln. Hierfür benutzten sie zur Kontrolle eine konventionelle PCR und nPCR, die das Rhoptery associated protein 1 Gen (RAP-1) amplifizierte. Sie entwickelten für 2 weitere Zielgene (BV5650 (BBOV_IV005650 Gen) und BV8970 (BBOV_IV008970 Gen)) neue Primer, die jeweils für eine PCR sowie eine weitere nPCR designiert wurden. Als Kontrolle untersuchten sie Blutproben von Rindern aus verschiedenen Ländern, wobei auch 24 Proben aus der Mongolei untersucht wurden. Die PCR der Genregion BV5650 hatte 22 (91,7 %) positive Resultate, wohingegen die nPCR nur 13 (54,2 %) positive Ergebnisse zeigte. Die PCR der Genregion BV8970 hatte nur 2 (8,33 %) positive Resultate, wohingegen bei der nPCR desselben Genabschnittes alle Proben negativ waren. Die Konventionelle PCR der RAP-1 Genregion war für 13 (54,2 %) der Proben positiv, die nPCR war hingegen negativ für die gesuchten Babesien.

Kurze Zeit später wurde in einer molekularepidemiologischen Studie die Phylogenie von *B. bovis* Isolaten anhand der Oberflächenproteingene Merozoite Surface Antigen-1 (MSA-1), MSA-2b und MSA-2c mit einer dafür entwickelten PCR untersucht. Dafür wurden 300 Blutproben von Rindern aus den Aimags Uvurkhangai, Uvs und aus den Somonen Tsenkhermandal, Jargalt-Khan, Undur-Khan, Dadal und Binder des Aimags Khentii verwendet. In allen Regionen wurde *B. bovis* nachgewiesen (Altangerel *et al.* 2012).

Babesia bigemina wurde das erste Mal in der Mongolei in denselben Regionen in Blutproben von mongolischen Rindern bei der Entwicklung einer nPCR für den spezifischen Nachweis von *B. bigemina*, welcher auf dem Nachweis der Gensequenz des AMA-1 (Apical Membrane Antigen-1) beruht, nachgewiesen. Hierfür wurde die davor entwickelte SpeI-AvaI nPCR spezifiziert, da diese ein Genfragment von *B. ovata* amplifizierte (Sivakumar *et al.* 2012).

Wiederum in Blutproben und *D. nuttalli* Zecken von Rindern aus den gleichen Gebieten wurden basierend auf der Analyse des Oberflächenproteins MPSP (Major Piroplasm Surface Protein) die 5 Genotypen (1,3,5,7 und N-3) von *Theileria orientalis* gefunden (Altangerel *et al.* 2011).

In mongolischen Rentieren konnten in 80 % der gesammelten 66 Blutproben aus dem Jahr 2006 *A. ovis* nachgewiesen werden. Die Untersuchung wurde durchgeführt, da es zu einigen ungeklärten Krankheitsfällen in der Rentierpopulation gekommen war und in der darauf folgenden Untersuchung in Blutausstrichen intraerythrozytäre Einschlusskörperchen gefunden worden waren (Haigh *et al.* 2008).

Bei der Entwicklung und Validierung einer nPCR für das Zielgen MSP5 wurde *Anaplasma marginale* das erste Mal molekularbiologisch in Blutproben mongolischer Rinder nachgewiesen. Eine Charakterisierung und ein Vergleich mit Gensequenzen der Gene MSP5, GroEL und 16S aus anderen Ländern zeigte, dass sich die in der Mongolei gefundenen *Anaplasma spp.* kaum von denen anderer Länder unterscheiden und sich eine *Anaplasma sp.* fand, die *Anaplasma ovis* ähnelte (Ybanez *et al.* 2013).

Zwei weitere kürzlich in der Mongolei nachgewiesene *Anaplasma spp.* sind *A. phagocytophilum* und *A. platys*. In einer Waldregion in dem Aimag Selenge wurden beide Erreger in Zecken der Arten *D. nuttalli* und *I. persulcatus* gefunden (Javkhlan *et al.* 2014).

Außerdem wurden *Borrelia bavariensis* ähnliche Stämme in *Ixodes persulcatus* Zecken, welche in dem Aimag Selenge gesammelt wurden mithilfe einer real-time PCR in 24,5 % der 372 untersuchten Zecken nachgewiesen (Scholz *et al.* 2013).

In einer weiteren Studie sollte die Durchseuchung mit Rickettsien in der mongolischen Zeckenpopulation untersucht werden. Hierfür wurden *D. nuttalli* und *I. persulcatus* Zecken auf das Vorkommen von verschiedenen *Rickettsia spp.* getestet. Es zeigte sich, dass *R. raoultii* die am häufigsten vorkommende Rickettsienart war und in beiden Zeckenarten und allen untersuchten Aimags (Khentii, Arkhangai, Dornod und Selenge) auftrat. *R. sibirica* konnte nur in dem Aimag Arkhangai nachgewiesen werden (Speck *et al.* 2012).

2.5 Zielsetzung der Studie

Der Nachweis von *B. bovis*, *B. bigemina*, *A. marginale* und *T. orientalis* in der Mongolei ist insofern relevant, als dass die genannten Pathogene eine enorme veterinärmedizinische Bedeutung haben, aber die bekannten Vektorzeckenarten (Kapitel 2.2.1 Tab. 2; Kapitel 2.2.2; Kapitel 2.2.3) in der Mongolei (Kapitel 2.4.3 Tab. 5) nicht vorkommen. Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob sich eine bekannte Vektorzeckenart bis in die Mongolei ausgebreitet hat oder ob eine bekannte lokale mongolische Zeckenart die Vektorfunktion ausüben könnte. Zudem war es von Interesse, sich ein Bild über die Ausbreitung der Infektionserreger in dem mongolischen Rinderbestand zu machen. Ein Screening auf weitere durch Zecken übertragbare Pathogene in dem mongolischen Rinderbestand und der mongolischen Zeckenpopulation sollte außerdem einen größeren Einblick in die durch Zecken übertragbare Erregervielfalt in dem Aimag Khentii geben. Die gewonnenen Informationen sollten die Grundlage einer eventuellen Interventionsstrategie gegen die genannten Erreger darstellen, da im Falle des Auftretens der gesuchten Pathogene mit einer schnellen Durchseuchung der naiven mongolischen Rinderpopulation zu rechnen ist.

3 Material und Methoden

3.1 Herdenfragebogen

Zur Erfassung der einzelnen Herden und der Tiergesundheit wurde mit der Unterstützung eines Dolmetschers ein Fragebogen für jede Herde ausgefüllt (siehe Kapitel 9.3). Hierbei wurden die Koordinaten des Probenortes mit einem GPS-Gerät erfasst und zusätzlich festgehalten, in welcher Vegetationszone sich die Herde aufhielt. Zudem wurde die Größe der Herde notiert. Es wurde weiterhin erfragt, wann und womit eine antiparasitäre Behandlung stattgefunden hatte und außerdem der Ernährungszustand der Herde ermittelt. Um mögliche Krankheitsgeschehen zu erfassen, wurde erfragt, ob die Rinder Hämoglobinurie zeigten, ob und welche Krankheitsfälle es in der Saison gegeben hatte und ob und wodurch es Todesfälle in der Herde gegeben hatte. Zuletzt sollten die Tierhalter noch berichten, ob es generell irgendwelche Auffälligkeiten in der Herde gab.

3.2 Probensammlung in der Mongolei

Aufgrund der bereits vorliegenden Ergebnisse der Arbeiten von (Altangerel *et al.* 2011; Altangerel *et al.* 2012; Sivakumar *et al.* 2012; Ybanez *et al.* 2013) wurden aus dem Aimag Khentii (siehe Kapitel 2.4.1 Abb. 1) die 6 Somone Tsenkhermandal, Dschargaltchaan, Delgerchaan, Binder, Dadal und Bajan-Adarga (Abb. 3) als Zielregionen der Studie ausgewählt. In den zu untersuchenden Somonen gab es im Jahr 2012 insgesamt ca. 60.000 Rinder (Persönliche Mitteilung von Battsetseg (2013)). Die Tierzahlen variierten in den einzelnen Somonen zwischen ca. 5000 Rindern in Delgerchaan und ca. 20.000 Rindern in Binder. Auf Basis der vorangegangenen Untersuchungen konnte von einer Prävalenz der Erreger in den zu untersuchenden Regionen in Khentii von mindestens 5 % ausgegangen werden. Bei einer Konfidenz von 95 % mussten nach Fosgate (2009) demnach mindestens 58 Rinder je Somon untersucht werden, um einen Erreger in der untersuchten Population nachzuweisen, wenn man von einem perfekten Test ausgeht. Da dies nicht der Fall war, wurden 80 Rinder pro Somon als Zielgröße festgesetzt.

Von Mai bis Juni 2013 wurden insgesamt 61 Herden untersucht. Je Somon wurden in der Regel 10 Herden per Zufall ausgewählt. In Tsenkhermandal waren es 11 Herden. Soweit es möglich

war, wurden je 8 ein- bis dreijährige Rinder zur Blutprobenentnahme zufällig ausgewählt. In einzelnen Fällen waren die beprobten Tiere älter oder jünger. Das Alter wurde von den Tierhaltern angegeben und nicht durch eine Zahnaltersbestimmung überprüft. Von jedem Tier wurde eine EDTA-Vollblutprobe aus der *Vena jugularis* gezogen und mindestens 5 Zecken, soweit vorhanden, abgesammelt. Die Anzahl der EDTA-Vollblutproben belief sich auf 481, da von einem festliegenden Rind zusätzlich eine Blutprobe gezogen wurde. Die gewonnenen Blutproben wurden in einer Kühlbox gekühlt. Möglichst zeitnah wurde darauf das Vollblut auf Whatman FTA[®] Filtercards aliquotiert.

Des Weiteren wurden Zecken mit einem Flanelltuch der Ausmaße 2x1 Meter aus der Vegetation in Herdennähe geflaggt und von den Jurten der Nomaden gesammelt, welche sich in den meisten Fällen in der Nähe der Tierpferche befanden. Zusätzlich wurden im Juni 2013 von lebend gefangenen Nagern aus den Somonen Bajan-Adarga und Dschargaltchan juvenile Zeckenstadien abgesammelt. Die Nager wurden mit Lebendfallen gefangen und nach dem Absammeln wieder frei gelassen. Versuche juvenile Zeckenstadien mit einem Flanelltuch aus den Bauten von Nagern zu flaggen blieben erfolglos. Alle Zecken wurden spätestens nach der Rückkehr in das Zentrum des Aimags in 70 %igen Ethanol oder 38 %igen Vodka eingelegt.



Abb. 3: Die Somone des Aimags Khentii modifiziert nach Anonym(c) (2017)

(Die Somone, in denen die Studie durchgeführt wurde, sind rot hervorgehoben.)



Abb. 4: Mongolische Rinder in einem Pferch vor der Probennahme mit zwei mongolischen Helfern, Khentii 2013



Abb. 5: Ein mongolischer Nomade hilft beim Einfangen seiner Rinder, Khentii 2013



Abb. 6: Zeckenbefall am Trierl eines mongolischen Rindes, Khentii 2013



Abb. 7: *Dermacentor nuttalli* Zecken auf einer mongolischen Jurte, Khentii 2013

3.3 Lagerung und Transport der Proben nach Deutschland

Alle Proben wurden nach Deutschland transportiert und in das Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin zur weiteren Untersuchung verbracht. Die Vollblutproben wurden dafür in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße aliquotiert. Hierfür wurden sie aufgetaut und nach dem Aliquotiervorgang wieder bei -20 °C eingefroren. Am Tag vor dem Transport wurde der Alkohol, in den die Zecken eingelegt waren, aus Flugsicherheitsgründen entfernt. Direkt nach der Ankunft in Berlin wurden die Zecken in 70 %igen Ethanol eingelegt.

3.4 Laborarbeit in Deutschland

3.4.1 Identifizierung der adulten Zecken

Die Artbestimmung der gesammelten adulten Zecken erfolgte anhand der morphologischen Merkmale nach den Beschreibungen von Tyron (1983) und Sondermann (1993).

Morphologie von *Dermacentor nuttalli* nach Sondermann (1993):

Die Schildzecke *Dermacentor nuttalli* wurde erstmals 1928 von Olenev beschrieben.

Nach Camicas (1998) gibt es folgende Synonyme für *Dermacentor nuttalli*:

Dermacentor birulai kukunoriensis Olenev, 1929

Dermacentor chacassicus Degtyarev, 1934

Dermacentor nuttalli chacassicum Degtyarev, 1934

Dermacentor (Dermacentor) nuttalli Olenev, 1928

Die einzigen umfassenden Angaben zur Morphologie sind bei Arthur (1960), Arthur (1962) und Tyron (1983) zu finden.

Die Morphologie der männlichen *Dermacentor nuttalli* Zecke ist Abb. 8 zu entnehmen.

1. Capitulum:

- Basis capituli typische Form, breiter als lang (1,0:0,75); hinterer Rand leicht konkav, Cornae zurückgebildet niedrig
- Lateralränder gerade, leicht divergierend in Richtung Palpenansatz

- Palpen mit breit gewölbten äußeren Rändern, 2. Glied mit rudimentärer Dorsalkante, Ventralsporn des 3. Gliedes fehlt

2. Dorsalseite (Conscutum):

- Körper länglich-oval, sich nach vorn verjüngend; unterschiedliche Grundfarbe dominiert, Punktierung des Rückenschildes gemischt, kräftig und klein, die ganze Oberfläche bedeckend, Emailleschmelz zwischen den Zervikalrinnen, nach dem ersten Drittel der Schildlängen gehen. Seitenarme des Musters zur Peripherie, Emailleschmelz setzt sich in der Mitte caudal fort, schließt Foveae ein und teilt sich schließlich in 4 Äste, welche die Testons gewöhnlich nicht erreichen; lateral der Foveae befindet sich je eine Insel mit Grundfarbe, seitlich begrenzt durch lineare Züge der Schmelzfarbe. Die seitlichen Furchen bestehen aus kräftigen und schließlich zusammenlaufenden Farbpunkten
- Testons deutlich ausgeprägt
- Augen am Seitenrand des Schildes, klein, rund, leicht gewölbt

3. Ventralseite (Bauchseite):

- Genitalöffnung zwischen 1. und 2. Coxae
- Analfurche umgreift Anus deutlich von hinten
- keine Analschilder vorhanden
- Stigmenöffnung (Peritrema) breit oval, nach hinten in einen kleinen, fast dreieckigen dorsalen Processus ausgezogen, der den Rand des Rückenschildes aber nicht erreicht; Rand der Stigmenplatte ohne dorsale Verdickung

4. Gliedmaßen:

- breit, kräftig, von mittlerer Länge, braune Grundfarbe
- Coxa I relativ kurz, äußerer Sporn breit, mit stumpfer Spitze; erreicht mit der Spitze den inneren Basisteil, erscheint dadurch am Hinterrand tief eingeschnitten
- Caxa IV am größten, in Längsrichtung gestreckt, sich zwischen Peritrema und Anus nach caudal schiebend
- Dorsalsporn des Trochanter fehlt meist
- Trochanter, Femur und Tibia mit kleinem rudimentären Zacken
- Tarsus und Prätarsus ventral drei Paar Sporne

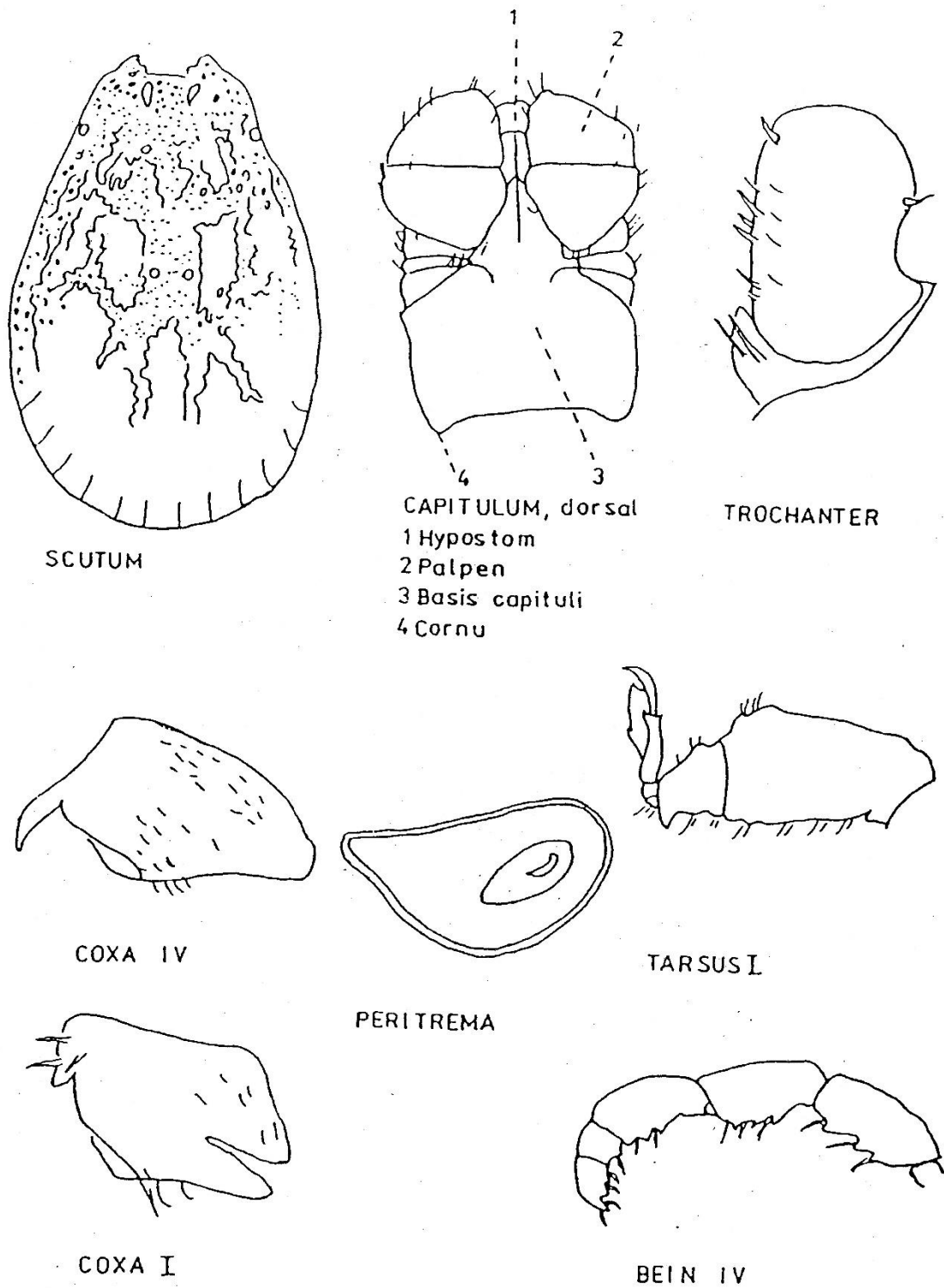


Abb. 8: *Dermacentor nuttalli*, Morphologie des Männchens nach Arthur (1962)

Die Morphologie der weiblichen *Dermaacentor nuttalli* Zecke ist in Abb. 9 dargestellt.

1. Capitulum:

- Basis capituli viereckig, fast doppelt so breit wie lang, hinterer Rand gewellt; Cornae fehlen; Lateralränder nicht gebogen; Porenfelder länglich-oval, schräg zur Körperlängsachse
- Palpen mit breit gerundeten äußeren Rändern, Dorsal- und Ventralhorn fehlen
- Hypostom: Zahnreihen 3-4/4-3

2. Dorsalseite (Skutum und Alloskutum):

- Rückenschild oval oder länglich-vieleckig; Ränder vor Augenhöhe konvex, danach winklig, Punktierung m.o.w. gleichmäßig; klein; Emaillenschmelz intensiv, bedeckt fast ganze Oberfläche des Rückenschildes; die Grundfarbe lokalisiert sich auf zwei Paar parallele Flecken in Höhe der Zervikalfurchen, um die Augen und bei manchen Exemplaren im hinteren Drittel des Medianfeldes
- Testons deutlich ausgeprägt
- Augen am Seitenrand des Schildes, klein, rund, leicht gewölbt

3. Ventralseite (Bauchseite):

- Genitalöffnung zwischen Coxae II begrenzt von kleinen flügelähnlichen Anhängseln (Projektionen)
- Analfurche umgreift Anus deutlich von hinten, ventrale Medianfurchung deutlich sichtbar
- Peritreme längs-oval mit stumpfen, rudimentären, dorsalgerichteten Prozessen; Rand der Stigmenplatte ohne dorsale Verdickung

4. Gliedmaßen:

- dick und von mäßiger Länge
- Coxae I klein, äußerer Sporn relativ breit und apikal stumpf abgerundet, erreicht mit der Spitze den inneren Basisteil, erscheint dadurch am Hinterrand tief eingeschnitten
- äußere Sporne von Coxae II bis IV fast gleiche Länge; bei Coxae IV kurz und stumpf und nicht über hinteren Rand hinausgehend
- Coxa IV nicht längsgestreckt
- dorsaler Trochantersporn kurz, breit gerundet, ziemlich schwach
- Ventralsporne auf Trochanter; Femur, Tibia fehlen oder sind nur schwach entwickelt

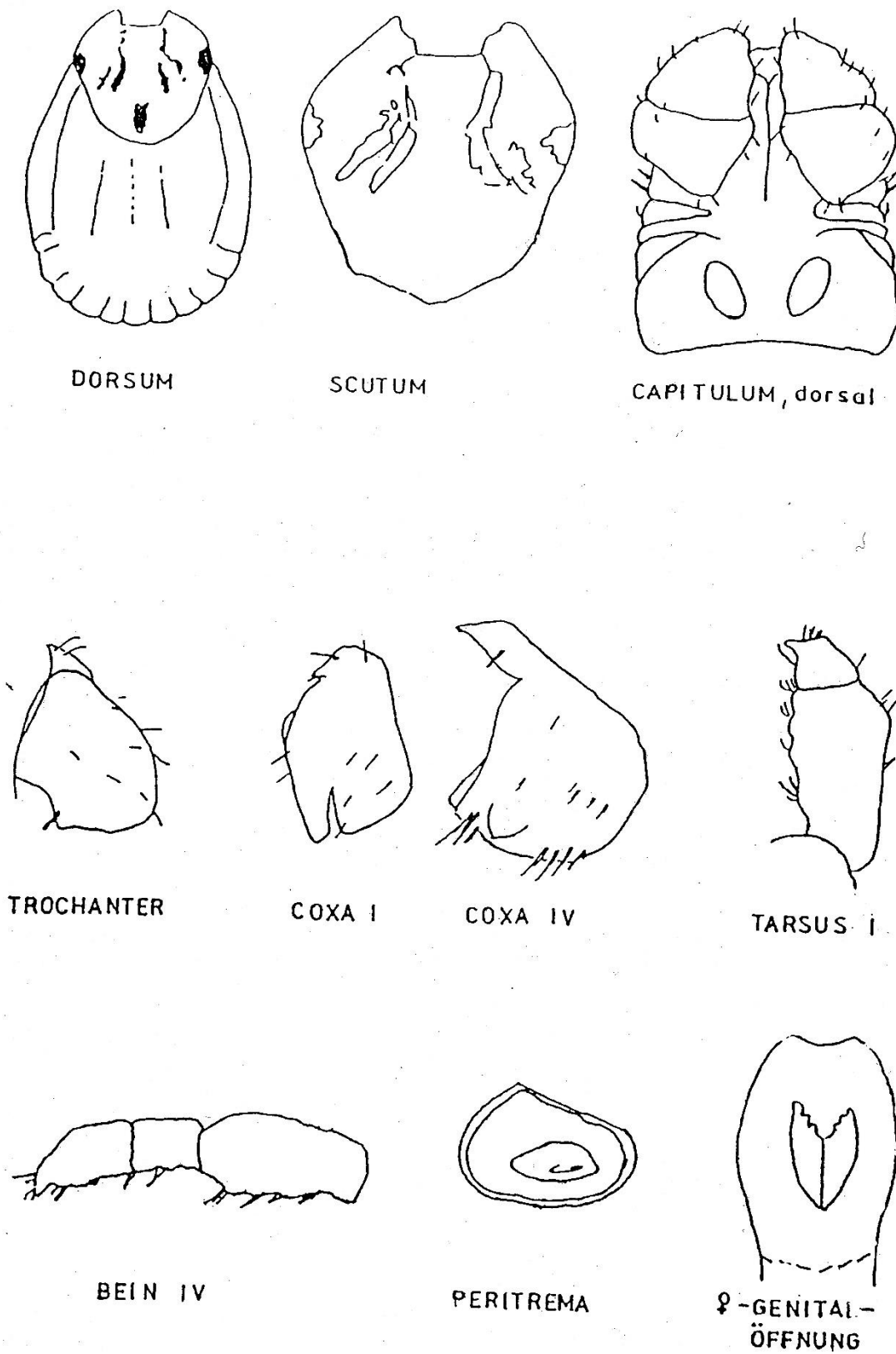


Abb. 9: *Dermacentor nuttalli*, Morphologie des Weibchens nach Arthur (1962)

Morphologische Abgrenzung von *D. nuttalli* zu *D. silvarum* bei der männlichen Zecke

Die Auswüchse der Peritremata von *D. nuttalli* reichen im Gegensatz zu den denen von *D. silvarum* nicht an den scutalen Rand heran.

Morphologische Abgrenzung von *D. nuttalli* zu *D. marginatus* bei der männlichen Zecke

Eine dorsale Verdickung der Peritremata ist bei *D. nuttalli* im Gegensatz zu *D. marginatus* nicht vorhanden.

Morphologische Abgrenzung von *D. nuttalli* zu *D. silvarum* bei der weiblichen Zecke

Das Capitulum der weiblichen *D. nuttalli* Zecke weist im Gegensatz zu dem von *D. silvarum* keine Cornae auf.

Morphologische Abgrenzung von *D. nuttalli* zu *D. marginatus* bei der weiblichen Zecke

Das Capitulum der weiblichen *D. nuttalli* Zecke weist im Gegensatz zu dem von *D. marginatus* keine Cornae auf.

3.4.2 Identifizierung der juvenilen Zeckenstadien

Es gibt kaum Literatur zur morphologischen Identifikation der in der Mongolei vorkommenden Zeckenlarven. Da die beschriebenen Unterschiede minimal und unter einem Mikroskop nur schwer zu erfassen sind, wurden die Zeckenlarven grob nach Aussehen eingeteilt. Anschließend wurden 10 Exemplare zufällig ausgewählt und molekularbiologisch untersucht, um sie einer Art zuzuordnen.

Die DNS Extraktion aus den Zeckenlarven erfolgte wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben, wobei hier die DNS aller Zeckenlarven einzeln extrahiert wurde. Die Bestätigung der morphologischen Einteilung erfolgte anhand einer PCR mit den Primern "Metastricata ITS-F" und "Metastricata ITS-R". Mit diesen Primern wird ein DNS-Fragment von ca. 785 bp Länge amplifiziert. Dieses Fragment enthält die ITS-2 Region, einen häufig verwendeten Marker der nukleären, ribosomalen DNS. Hierzu wurde ein Mastermix erstellt (siehe Tab. 6). Im Anschluss wurden die Proben im Thermocycler unter Verwendung des "ITS2-PRIMER" Protokolls amplifiziert (Tab. 7). Die PCR-Produkte wurden wie in Kapitel 3.4.13 beschrieben aufgereinigt und zur Sequenzierung zu LGC Genomics geschickt.

Tab. 6: Ansatz des Mastermixes einer PCR Reaktion für eine anschließende Sequenzierung der ITS-2 Region von Zecken

PCR Mastermix	Zusatz je Probe (µl)
H ₂ O	12,75
Phusion HF-Buffer	5,00
Metastriata ITS-F	1,00
Metastriata ITS-R	1,00
dNTPs	2,50
Phusion High-Fidelity Taq Polymerase (2 U/µl)	0,25
Gesamtvolumen je Probe ohne DNS	22,50
DNS je Probe	2,50

Tab. 7: "ITS2-PRIMER" Protokoll des Thermocyclers für die Amplifizierung der ITS2 Region von Zecken

Schritt	Beschreibung	Dauer	Temperatur
1.	Schmelzen (Denaturierung, eng. melting)	30 Sek.	98 °C
2.	Schmelzen	7 Sek.	98 °C
3.	Primerhybridisierung (engl. annealing)	10 Sek.	60 °C
4.	Vervielfältigung	20 Sek.	72 °C
5.	<i>40 Wiederholungen der Schritte 2-4</i>		
6.	Abschließende Vervielfältigungsphase	5 Min.	72 °C

3.4.3 DNS Extraktion aus adulten Zecken

Für die DNS Extraktion aus den adulten Zecken wurde das NucleoSpin® Tissue Kit verwendet. Zuerst wurden die Zecken zwei Mal mit Aqua bidest gewaschen, um anhängenden Schmutz zu entfernen. Anschließend wurden die Zecken auf Zellstoff an der Luft getrocknet und jeweils einzeln in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. In dem Reaktionsgefäß wurden sie mit einem Pistill zerstoßen, um die Gewebestruktur zu zerstören. Zum Auflösen der Zellstrukturen wurden im Anschluss 25 µl Proteinase K und 180 µl T1 Puffer hinzugegeben.

Der Ansatz wurde über Nacht bei 56 °C im Thermomixer inkubiert. Am nächsten Tag wurden jeweils 200 µl BQ1 und 200 µl Ethanol 99,9 % hinzugegeben. Das Gemisch wurde, nachdem es mithilfe eines Vortexers gut gemischt worden war, in die einzelnen Wells der NucleoSpin 8[®] Tissue Binding Strips überführt und unter Verwendung einer Vakuumpumpe durch die Membran Binding Strips gesaugt. Die DNS blieb bei diesem Schritt durch polare Wechselwirkungen an der Silica Membran der Wells hängen. Es folgte ein Waschschriff mit 600 µl BW Puffer und zwei mit jeweils 900 µl B5 Puffer, um die Zellfragmente aus der Membran zu spülen. Nach einem folgenden Trocknungsschritt der Membran wurde die DNS im letzten Schritt mit 100 µl des Elutionspuffer eluiert. Direkt im Anschluss wurde das Eluat in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C eingefroren.

3.4.4 DNS Extraktion aus Zeckenlarven

Die DNS Extraktion aus den Zeckenlarven erfolgte weitestgehend, wie die DNS Extraktion aus adulten Zecken. Jedoch wurden die Zeckenlarven gepoolt. Hierbei wurden alle unbeschädigten Zeckenlarven, die von einem Nager stammten, zu einer Probe zusammengefasst. Nur aus einigen Zeckenlarven wurde die DNS einzeln extrahiert, um bei diesen molekularbiologisch wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben die Art zu bestimmen. Zur Zerstörung der Gewebestruktur wurden die Zeckenlarven anders als bei den adulten Zecken auf einem Objektträger mit einem Skalpell zerschnitten und anschließend in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die restliche Extraktion erfolgte wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben.

3.4.5 DNS Extraktion aus Vollblutproben

Zur DNS Extraktion aus EDTA-Vollblutproben wurde das NucleoSpin[®] Blood Kit benutzt und erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Hiernach wurde zunächst 200 µl EDTA-Vollblut mit 25 µl Proteinkinase K versetzt. Anschließend wurden 200 µl B3 Puffer hinzupipetiert und die Probe gut gevortext. Im Anschluss wurde die Probe für 15 Min. bei 70 °C im Thermomixer inkubiert. Nach der Zugabe von 210 µl Ethanol (96-100 %) wurden die Proben erneut gevortext und dann auf NucleoSpin[®] Blood Columns überführt. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 11000 × g wurde die Probe darauf mit 500 µl BW Puffer und danach mit 600 µl B5 Puffer gewaschen, wonach jeweils für eine Minute bei 11000 × g zentrifugiert wurde. Nach einer erneuten Zentrifugation unter gleichen Bedingungen zur Trocknung der Silica Membran der NucleoSpin[®] Blood Column wurde die Membran mit 100 µl Elutionspuffer, der auf 70 °C

vorgeheizt worden war, inkubiert und im Anschluss für eine Minute bei $11000 \times g$ abzentrifugiert.

3.4.6 DNS Extraktion aus auf Whatman FTA[®] Filtercards aufgebrachten Blutproben

Von dem mit Blut getränkten Bereich der Whatman FTA[®] Filtercards wurden 16 runde Scheiben mithilfe eines Harris Micro-Punch in der Größe von 3 mm Durchmesser ausgestanzt und in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Der Harris Micro-Punch wurde zwischen jedem Probenwechsel in eine 2 %ige Wasserstoffperoxid-Lösung getaucht und der Stanzstempel mindestens fünf Mal durchgedrückt, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Im Anschluss wurde der Harris Micro-Punch in destilliertes Wasser getaucht und mit einem sauberen trockenen Tuch abgewischt. Die Proben wurden zwei Mal für jeweils 15 Minuten mit 500 µl Whatman FTA[®] purification reagent gewaschen und zu diesem Zweck für die angegebene Zeit in einen Thermomixer bei Raumtemperatur mit 800 UpM. gestellt. Unter den gleichen Einstellungen des Thermomixers wurden die Proben darauf zwei Mal für 15 Minuten mit 1,0 ml TE⁻¹ gewaschen. Im Anschluss wurden die Proben für 60 Minuten bei 45 °C im Thermomixer getrocknet. Im nächsten Schritt wurden 100 µl einer 5 %igen wässrigen Suspension des Chelex[®] 100 resin hinzugegeben und im Thermomixer bei 90 °C und 300 UpM für 30 Minuten inkubiert. Zuletzt wurden die Proben bei $20.000 \times g$ für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, ohne hierbei Chelex[®] 100 resin Pellets zu übertragen. Die Proben wurden im Anschluss bei -20 °C gelagert.

3.4.7 DNS Konzentrationsmessung

Der Erfolg der DNS Extraktion wurde überprüft, indem mit dem EPOCH[®] Biotek Spektralphotometer und der Software Gen5TM die DNS Konzentration in den finalen Eluaten gemessen wurde. Dies erschien sinnvoll, da die gewonnene DNS die Grundlage für alle weiteren molekularbiologischen Untersuchungen darstellte, welche durch eine unpassende DNS Konzentration oder eventuelle Verunreinigungen hätten verfälscht werden können. Zur Konzentrationsmessung wurde zu Beginn das EPOCH[®] Biotek Spektralphotometer mit der Elutionsflüssigkeit geeicht, indem jeweils 2 µl auf 2 nebeneinanderliegende Punkte der Take 3 Platte pipettiert wurde. Auf diese wurde das Gerät geeicht. Anschließend wurden zwei Mal jeweils 2 µl der DNS Proben nebeneinander auf die Take 3 Platte pipettiert und beide gemessen.

Der Durchschnittswert beider Messergebnisse diene als Richtwert für die Bewertung der Qualität der DNS Probe.

3.4.8 Prinzip eines PCR basierten Reverse Line Blot Hybridization Assays

Das PCR basierte Reverse Line Blot Hybridization Assay (RLB) ist ein hochspezifisches diagnostisches Verfahren, um bis zu 43 Pathogene gleichzeitig nachweisen zu können. Das Prinzip ist in Abb. 10 dargestellt.

Um ein RLB durchzuführen, benötigt man zuerst eine oder mehrere vorgeschaltete PCRs. Die PCR Reaktionen vervielfältigen bestimmte Genabschnitte mit hypervariablen Regionen, die sich von Erreger zu Erreger unterscheiden und später im RLB für einen spezifischen Nachweis benötigt werden. Die PCR-Produkte können vor dem Aufbringen auf die RLB Membran gemischt werden, damit man nur einen RLB Durchlauf benötigt.

Bevor die RLB Membran verwendet werden kann, müssen bestimmte Oligonukleotide (RLB-Sonden), die vorher so designt wurden, dass sie nur an ganz bestimmte hypervariable Regionen der PCR-Produkte binden, auf der Membran fixiert werden. Dies geschieht mit einem Mini-Blotter, der 45 kleine Kanäle aufweist und mit dem auch später der RLB durchgeführt wird. Die Fixierung der RLB-Sonden erfolgt in maximal 43 Linien unter Verwendung dieser Kanäle auf der Membran. Die beiden äußeren Kanäle des Mini-Blotters werden mit indischer Tinte gefüllt, welche die ansonsten weiße Membran schwarz färbt und so eine Orientierung ermöglicht.

Führt man eine RLB Untersuchung durch, muss nun die Membran um 90° gedreht in den Mini-Blotter eingespannt werden. Das führt dazu, dass die PCR-Produkte, welche nun in die Kanäle pipettiert werden, mit allen RLB-Sonden der Membran Kontakt haben und sich jetzt hochspezifisch an diese binden können. Nach einem Waschprozess der Membran kann man die gebundenen RLB-Sonden durch ein Lumineszenzverfahren sichtbar machen und erhält so Signale, die einem anzeigen, welche Probe an welche RLB-Sonde gebunden hat. Man weiß dann, welcher Erreger in welcher Probe vorhanden ist, wobei auch mehrere Erreger in einer Probe nachgewiesen werden können.

Im Anschluss kann man durch das Strippen der Membran die PCR-Produkte wieder von den RLB-Sonden lösen und abwaschen, wodurch die Membran erneut für mindesten 20 RLB Durchläufe verwendet werden kann.

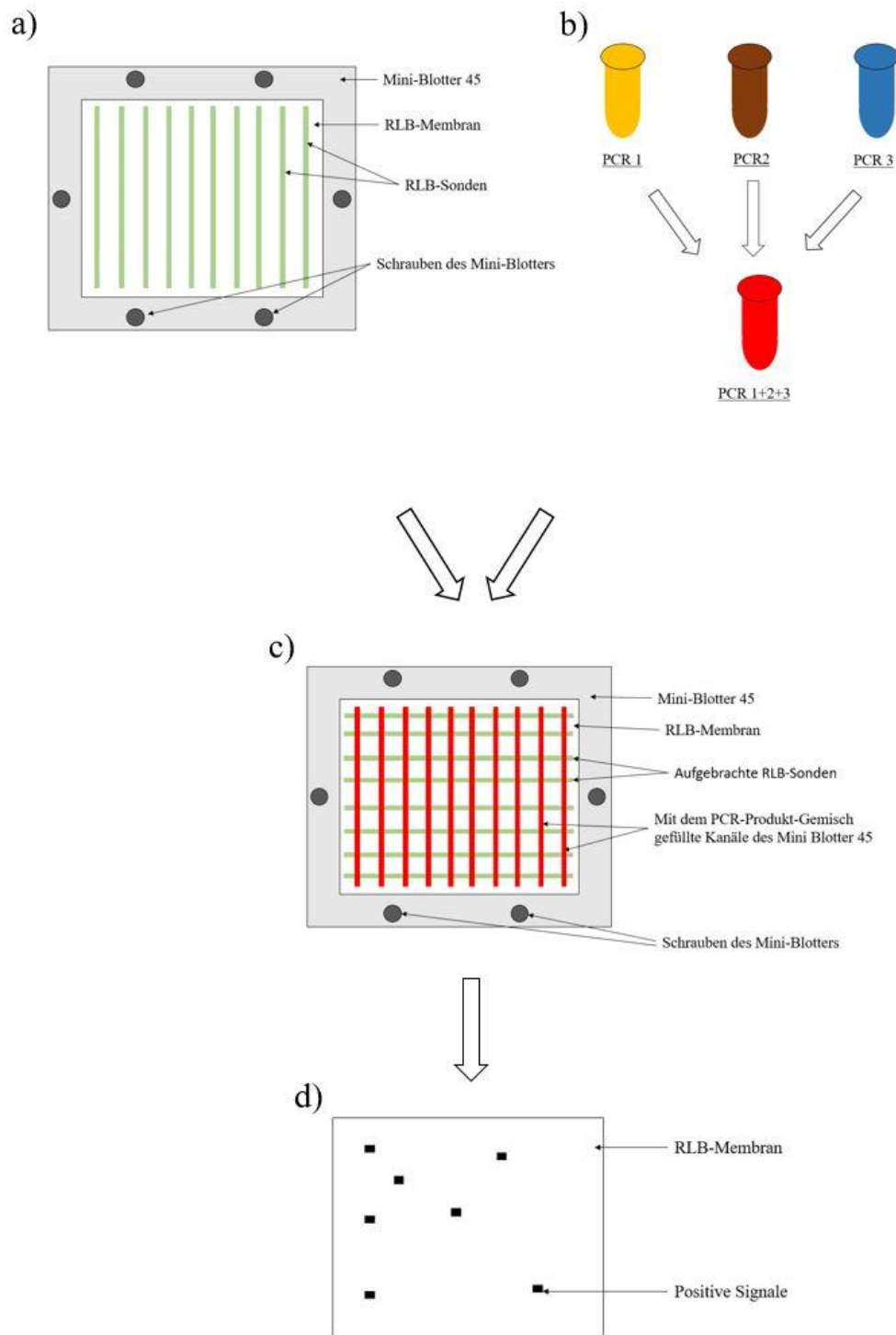


Abb. 10: Prinzip des PCR basierten Reverse Line Blot Hybridization Assays (RLB)

- Die Sonden werden kovalent an die RLB-Membran gebunden.
- Die Produkte der vorgeschalteten PCR Reaktionen werden gemischt.
- Durchführung eines RLB, wobei die PCR-Produkte an die RLB-Sonden binden können.
- Sichtbarmachung der gebundenen Sonden mithilfe von Chemolumineszenz.

3.4.9 PCR für die anschließende Durchführung eines Reverse Line Blot Hybridization Assays

Es wurden 3 verschiedene PCR Reaktionen durchgeführt, um eventuell vorhandene DNS der gesuchten Pathogene später im RLB nachweisen zu können. Es wurde eine PCR für den Nachweis des 18S-rRNS Gens der *Babesia* spp. und *Theileria* spp., eine PCR für den Nachweis des 16S rRNS Gens der *Rickettsiales* und eine weitere PCR für den Nachweis der 5S-23S Region der *Borrelia* spp. durchgeführt. Der Einsatz bestimmter Primer (Tab. 8) diente dazu, die DNS der für die RLB Untersuchung geeigneten Zielgene zu amplifizieren, um diese falls vorhanden später nachzuweisen. Je nach Zielgen und eingesetzter Reagenzien mussten im ersten Schritt unterschiedliche Mastermixe erstellt werden. Im Anschluss wurde der jeweilige Mastermix auf die einzelnen PCR Reaktionsgefäße aufgeteilt. Für die Durchführung einer PCR Reaktion wurden 22,5 µl des Mastermixes mit 2,5 µl DNS auf 25 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Zur Kontrolle lief bei jeder PCR Reaktion immer eine Positiv- und eine Negativkontrolle mit. Die so vorbereiteten Proben durchliefen im Anschluss in einem Thermocycler je nach PCR unterschiedliche Temperaturverlaufsprotokolle.

Tab. 8: Liste der verwendeten Primer

Primer	Sequenzen der Primer (5'-3'-Richtung)	Zielsequenz
RLB F2	GACACAGGGAGGTAGTGACAAG	18S rRNS
RLB R2	Biotin-CTAAGAATTTACCTCTGACAGT	18S rRNS
Ehr F2	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rRNS
Ehr R2	Biotin-GAGTTTGCCGGGACTT(CT)TTCT	16S rRNS
AnaEhrl full-R	CCCTAGTCACTRACCCAACCTTA	16S rRNS
Borrelia 23SN2	ACCATAGACTCTTATTACTTTGACCA	5S-23S Region rDNS
Borrelia 5SCB	Biotin-GAGAGTAGGTTATTGCCAGGG	5S-23S Region rDNS
AM-49F1	GTGTTCTGGGGTACTCCTATGTGAACCAAG	MSP5
AM-595R1	AAGCATGTGACCGCTGACAACTTAAACAG	MSP5
AMgrES-111F1	AGAGCTCGAAGGAAAGAAGTTCATAGT	GroEL
AMgroEL-1557R1	CATGAATACAGCTGCRAAGTGACACAGCCA	GroEL
Metastriata ITS-F	AGGACACACTGAGCACTGATTC	IST-2 Region

Primer	Sequenzen der Primer (5'-3'-Richtung)	Zielsequenz
Metastriata ITS-R	ACTGCGAAGCACTT(AG)GACCG	IST-2 Region

3.4.9.1 PCR für den Nachweis des 18S-rRNS Gens der *Babesia* spp. und *Theileria* spp.

Für den Nachweis der DNS von eventuell vorhandenen *Babesia* oder *Theileria* spp. wurde das 18S Gen der ribosomalen RNS verwendet. Die Amplifizierung dieses Gens sollte durch den Einsatz der Primer RLB F2 und RLB R2 (Tab. 8) erfolgen, welche im "Ansatz des Mastermixes einer PCR Reaktion zur anschließenden Durchführung eines RLB" (Tab. 9) eingesetzt wurden. Darauf durchliefen die vorbereiteten Proben im Thermocycler das "Protokoll des Thermocyclers für die Babesien und Theilerien PCR sowie einer *Rickettsiales* PCR" (Tab. 10).

3.4.9.2 PCR für den Nachweis des 16S-rRNS Gens der *Rickettsiales*

Für den Nachweis eventuell vorhandener DNS von Ehrlichien, Anaplasmen, Rickettsien, Neoehrlichien und Midichloria wurde ebenfalls das 16S Gen der ribosomalen RNS verwendet. Hier erfolgte die Amplifizierung durch die Primer Ehr F2 und Ehr R2 (Tab. 8). Der Ansatz des Mastermixes (Tab. 9) und das Protokoll des Thermocyclers (Tab. 10) waren dieselben wie bei der PCR für den Nachweis von *Babesia* spp. und *Theileria* spp. (siehe Kapitel 3.4.9.1).

3.4.9.3 PCR für den Nachweis der 5S-23S Region der *Borrelia* spp.

Für die Amplifizierung möglicher Borrelien DNS des Genabschnitts zwischen der 5S und 23S ribosomaler RNS wurden die Primer *Borrelia* 23SN2 und *Borrelia* 5SCB (Tab. 8) eingesetzt und das " Protokoll des Thermocyclers für die Borrelien PCR " (Tab. 11) verwendet.

Tab. 9: Ansatz des Mastermixes einer PCR Reaktion zur anschließenden Durchführung eines RLB

PCR Mastermix	Zusatz je Probe (µl)
H ₂ O	12,75
MgCl ₂	2,50
Maxima Hot Start Puffer	2,50
Vorwärts Primer	1,00
Rückwärts Primer	1,00
dNTPs	2,50
Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase	0,25
Gesamtvolumen je Probe ohne DNS	22,50
DNS je Probe	2,50

Tab. 10: Protokoll des Thermocyclers für die Durchführung einer Babesien und Theilerien PCR sowie einer *Rickettsiales* PCR

Schritt	Beschreibung	Dauer	Temperatur
1.	Schmelzen	4 Min.	95 °C
2.	Schmelzen	20 Sek.	95 °C
3.	Primerhybridisierung	30 Sek.	67 °C
4.	Vervielfältigung	30 Sek.	72 °C
5.	<i>Wiederholung der Schritte 2-4</i>		
6.	Schmelzen	20 Sek.	95 °C
7.	Primerhybridisierung	30 Sek.	65 °C
8.	Vervielfältigung	30 Sek.	72 °C
9.	<i>Wiederholung der Schritte 6-8</i>		
10.	Schmelzen	20 Sek.	95 °C
11.	Primerhybridisierung	30 Sek.	63 °C
12.	Vervielfältigung	30 Sek.	72 °C
13.	<i>Wiederholung der Schritte 10-12</i>		
14.	Schmelzen	20 Sek.	95 °C
15.	Primerhybridisierung	30 Sek.	61 °C
16.	Vervielfältigung	30 Sek.	72 °C
17.	<i>Wiederholung der Schritte 14-16</i>		
18.	Schmelzen	20 Sek.	95 °C
19.	Primerhybridisierung	30 Sek.	59 °C
20.	Vervielfältigung	30 Sek.	72 °C
21.	<i>Wiederholung der Schritte 18-20</i>		
22.	Schmelzen	20 Sek.	95 °C
23.	Primerhybridisierung	30 Sek.	57 °C
24.	Vervielfältigung	30 Sek.	72 °C
25.	<i>34 Wiederholungen der Schritte 22-24</i>		
26.	Abschließende Amplifikationsphase	7 Min.	72 °C

Tab. 11: Protokoll des Thermocyclers für die Borrelien PCR

Schritt	Beschreibung	Dauer	Temperatur
1.	Schmelzen	4 Min.	95 °C
2.	Schmelzen	20 Sek.	95 °C
3.	Primerhybridisierung	30 Sek.	60 °C
4.	Vervielfältigung	30 Sek.	72 °C
5.	<i>Wiederholung der Schritte 2-4</i>		
6.	Schmelzen	20 Sek.	95 °C
7.	Primerhybridisierung	30 Sek.	58 °C
8.	Vervielfältigung	30 Sek.	72 °C
9.	<i>Wiederholung der Schritte 6-8</i>		
10.	Schmelzen	20 Sek.	95 °C
11.	Primerhybridisierung	30 Sek.	56 °C
12.	Vervielfältigung	30 Sek.	72 °C
13.	<i>Wiederholung der Schritte 10-12</i>		
14.	Schmelzen	20 Sek.	95 °C
15.	Primerhybridisierung	30 Sek.	54 °C
16.	Vervielfältigung	30 Sek.	72 °C
17.	<i>Wiederholung der Schritte 14-16</i>		
18.	Schmelzen	20 Sek.	95 °C
19.	Primerhybridisierung	30 Sek.	52 °C
20.	Vervielfältigung	30 Sek.	72 °C
21.	<i>Wiederholung der Schritte 18-20</i>		
22.	Schmelzen	20 Sek.	95 °C
23.	Primerhybridisierung	30 Sek.	50 °C
24.	Vervielfältigung	30 Sek.	72 °C
25.	<i>34 Wiederholungen der Schritte 22-24</i>		
26.	Abschließende Amplifikationsphase	7 Min.	72 °C

3.4.10 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung des Erfolges der PCR Reaktion wurden 5 µl der PCR-Produkte mit 2 µl Proben-Ladepuffer (6x Loading Dye (LD)) und 5 µl Aqua bidest gemischt und auf 1,5 %ige Agarosegele (1,5 g Agarose in 100 ml 1 x TAE Lösung) aufgebracht und anschließend bei 6 V/cm in der Elektrophorese-Kammer, die mit einem 1 x TAE Puffer gefüllt war, aufgetrennt. Als Größenkontrolle lief immer ein geeigneter Marker (100bp, 1kb oder λ EcoRI/HindIII Marker) mit, an dem man das Molekulargewicht der erwarteten PCR-Produkt-Banden ablesen konnte. Anschließend wurden die Agarosegele mit der G:Box Geldokumentation und der GeneSnap Software ausgewertet.

3.4.11 Reverse Line Blot Hybridization Assay (RLB)

3.4.11.1 Präparation der RLB Membran

Zur Durchführung eines RLB wurde eine Biodyne[®] Membran verwendet. Sie wurde im ersten Schritt so zurechtgeschnitten, dass sie in einen Mini-Blotter passte. Mit einem Kugelschreiber wurde der Rand markiert, um eine spätere Identifizierung zu ermöglichen. Die Membran wurde im Anschluss durch zehnmütiges Waschen in 10 ml einer 16 %igen EDAC Lösung aktiviert. Anschließend wurde sie zusammen mit einem Polsterblatt in den Mini-Blotter eingelegt und fixiert, indem die Schrauben des Blotters kontrolliert angezogen wurden. Mit einer Vakuumpumpe wurde die restliche Flüssigkeit, welche sich noch in den Rillen befand, abgesaugt. Für den nächsten Schritt wurden Oligonukleotidlösungen (RLB-Sonden) (siehe Tab. 12) benötigt, die in unterschiedlichen Firmen (Invitrogen[™] by Life technologies[™], Carlsbad, USA; Eurogentec, Lüttich, Belgien und Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA) hergestellt wurden. Die RLB-Sonden wurden zum Aufbringen auf die RLB-Membran vorbereitet, indem jeweils 4 µl der 100 pmol/µl Stocklösungen in 150 µl 0.5 M NaHCO₃ mit einem pH von 8,4 aufgelöst wurden. Die so präparierten Oligonukleotidlösungen wurden in die Öffnungsschlitze pipettiert. Dort banden sie sich irreversibel an die aktivierte Membran. Um eine Orientierung auf der weißen Membran zu ermöglichen, wurden der erste und letzte Schlitz mit indischer Tinte, welche in 2x SSPE 10 Mal verdünnt wurde, aufgefüllt. Die Tinte färbte die Membran an diesen Stellen schwarz, was zur späteren Orientierung diente. Es folgte eine Inkubationszeit von einer Minute bei Raumtemperatur. Darauf wurden die Flüssigkeiten aus den Schlitzen in der gleichen Reihenfolge abgesaugt, in der sie aufgebracht wurden. Im

Anschluss wurde die Membran aus dem Blotter entfernt und in 100 ml einer frisch vorbereiteten 100 mM NaOH-Lösung für 8 Min. gewaschen, um das EDAC zu deaktivieren. Zuletzt wurde die Membran mit 100 ml 2x SSPE/0,1 % SDS bei 60 °C für 5 Min. in einem Wasserbad gewaschen. Danach war die Membran fertig für den Gebrauch.

Tab. 12: Liste der im RLB verwendeten Sonden

RLB-Sonden	Basensequenz (5'→3')	Quelle
Bacteria catch-all	CTACGGGAGGCAGCAGT	diese Studie
<i>Anaplasma/Ehrlichia</i> catch-all	GGGGGAAAGATTTATCGCTA	(Bekker <i>et al.</i> 2002)
<i>A. bovis</i>	GTAGCTTGCTATGAGAACA	(Bekker <i>et al.</i> 2002)
<i>A. centrale</i>	TCGAACGGACCATACGC	(Bekker <i>et al.</i> 2002)
<i>A. marginale</i>	GACCGTATACGCAGCTTG	(Bekker <i>et al.</i> 2002)
<i>A. mongolia</i>	GTATATGCAGCTTGCTGCGTATAC	diese Studie
<i>A. mongolia</i> 2	CCACCAAGGCGGTGATCTGT	diese Studie
<i>A. mongolia</i> 3	TATACGGTTAGTGGCAGACGG	diese Studie
<i>A. mongolia</i> 4	CCCACCAAGGCGGTGATCT	diese Studie
<i>A. phagocytophilum</i> 1	TTGCTATAAAGAATAATTAGTGG	(Schouls <i>et al.</i> 1999)
<i>A. phagocytophilum</i> 2	TTGCTATGAAGAATAATTAGTGG	(Giangaspero <i>et al.</i> 2015)
<i>A. phagocytophilum</i> 3	TTGCTATAAAGAATAGTTAGTGG	(Giangaspero <i>et al.</i> 2015)
<i>A. phagocytophilum</i> 4	TTGCTATAGAGAATAGTTAGTGG	(Giangaspero <i>et al.</i> 2015)
<i>A. platys</i>	GTCGTAGCTTGCTATGATA	diese Studie
<i>E. canis</i>	TCTGGCTATAGGAAATTGTTA	(Schouls <i>et al.</i> 1999)
<i>E. ruminantium</i>	AGTATCTGTTAGTGGCAG	(Bekker <i>et al.</i> 2002)
<i>Babesia</i> catch-all 1	ATTAGAGTGTTTCAAGCAGAC	(Bhoora <i>et al.</i> 2009)
<i>Theileria/Babesia</i> catch-all	CTGTCAGAGGTGAAATTCT	(Gubbels <i>et al.</i> 1999)
<i>Babesia</i> catch-all 2	ACTAGAGTGTTTCAAACAGGC	(Bhoora <i>et al.</i> 2009)

RLB-Sonden	Basensequenz (5'→3')	Quelle
<i>B. bigemina</i>	CGTTTTTCCCTTTTGTGG	(Gubbels <i>et al.</i> 1999)
<i>B. bovis</i>	CAGGTTTCGCCTGTATAATTGAG	(Gubbels <i>et al.</i> 1999)
<i>B. caballi</i>	GTGTTTATCGCAGACTTTTGT	(Butler <i>et al.</i> 2008)
<i>B. canis</i>	TGCGTTGACGGTTTGAC	(Matjila <i>et al.</i> 2005)
<i>B. divergens</i>	TGTTAATATTGACTAATGTGCGAG	(Gubbels <i>et al.</i> 1999)
<i>B. gibsoni</i> Japan	TACTTGCCTTGTCTGGTTT	diese Studie
<i>B. microti</i>	G(GA)CTTGGCATC(AT)TCTGGA	(Matjila <i>et al.</i> 2008)
<i>B. venatorum</i>	CGATTTTCGCTTTTGGGATT	(Nijhof <i>et al.</i> 2007)
<i>Theileria</i> catch-all	ATTAGAGTGCTCAAAGCAGGC	(Bhoora <i>et al.</i> 2009)
<i>T. buffeli</i> (<i>Theileria orientalis</i>)	GGCTTATTTTCGG(AT)TTGATTTT	(Garcia-Sanmartin <i>et al.</i> 2006)
<i>T. equi</i> A1	TTGGCGTTTGTTCATCGTTGC	diese Studie
<i>T. equi</i> A2	GTTGTGGCTTAGTTGGGGCAT	diese Studie
<i>T. equi</i> B	CTGTATCGTTATCTTCTGCTTGACA	diese Studie
<i>Midichloria</i> catch-all	GCGAAATAACAGTTGGAAGCAAT	diese Studie
<i>Neoehrlichia</i> catch-all	GGAATAGCTGTTAGAAATGACAGG	diese Studie
<i>Neoehrlichia mikurensis</i>	GCTGTAGTTTACTATGGGTA	(Schouls <i>et al.</i> 1999)
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	CTTTGACCATATTTTATCTTCCA	(Schouls <i>et al.</i> 1999)
<i>Borrelia burgdorferi</i> s. 1. 2	TTTTATCTTCCATCTCTATTTTGCC	diese Studie
<i>Bor. burgdorferi</i> s.s.	AACACCAATATTTAAAAAACATAA	(Schouls <i>et al.</i> 1999)
<i>Bor. afzelii</i>	AACATTTAAAAATAAATTCAAGG	(Schouls <i>et al.</i> 1999)

RLB-Sonden	Basensequenz (5'→3')	Quelle
<i>Bor. garinii</i>	AACATGAACATCTAAAAACATAAA	(Schouls <i>et al.</i> 1999)
<i>Bor. valaisiana</i>	CATTAAAAAATATAAAAAATAAATTTAACG	(Schouls <i>et al.</i> 1999)
<i>Rickettsia catch-all</i>	TTTAGAAATAAAAGCTAATACCG	(Christova <i>et al.</i> 2003)
<i>Rickettsia raoultii</i>	CTAATACCGCATATTCTCTACG	(Nijhof <i>et al.</i> 2007)

3.4.11.2 Durchführung eines RLB

Zur Durchführung eines RLB wurden zuerst jeweils 10 µl PCR-Produkt-Lösung aus der Babesien/Theilerien-, *Rickettsiales*- und Borrelien-PCR mit 130 µl 2x SSPE / 0,1 % SDS auf insgesamt 160 µl Probenvolumen zusammengeführt. Mit den Positiv- und Negativkontrollen wurde in gleicher Weise verfahren. Zur Denaturierung der PCR-Produkte wurden die so vorbereiteten Proben bei 100 °C für 10 Min. in einem Thermomixer erhitzt. Dies diente zur Denaturierung vorhandener DNS. Anschließend wurden die Proben direkt auf Eis gekühlt, um ein erneutes Zusammenlagern der DNS Stränge zu verhindern. Es folgte eine kurze Zentrifugation, um eventuelle Flüssigkeitsansammlungen von dem Deckel des Eppendorf Reaktionsgefäßes zu entfernen. Darauf wurden alle Proben bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Die RLB-Membran wurde für 5 Min. mit 2x SSPE / 0,1 % SDS bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend in einem MN45 Mini-Blotter unter Verwendung eines Polsterblattes platziert. Die restliche Flüssigkeit wurde aus den Schlitzen abgesaugt. Darauf wurden 140 µl der vorbereiteten Proben in die Schlitze unter Vermeidung von Luftblasen pipettiert. Die leeren Schlitze wurden mit 2x SSPE / 0,1 % SDS gefüllt, um ein Austrocknen der Membran zu verhindern. Im nächsten Schritt wurde der Mini-Blotter bei 42 °C für 60-90 Min. in einem Hybridisationsofen platziert, damit die PCR-Produkte mit den an der Membran gebundenen Oligonukleotiden hybridisieren konnten. Im Anschluss wurde die Flüssigkeit aus den Schlitzen des Mini-Blotters mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und die RLB-Membran aus dem Blotter entfernt. Um die nicht hybridisierten PCR-Produkte zu entfernen, wurde die RLB-Membran zwei Mal mit 2x SSPE / 0,5 % SDS für 10 Min. bei 55 °C im Wasserbad unter leichtem Schwenken gewaschen. Im Anschluss wurde die RLB-Membran in einem Hybridisationsofen bei 42 °C für 30 Min. in 50 ml 2x SSPE / 0,5 % SDS, welches mit 5 µl Streptavidin versetzt worden war, inkubiert. Während dieses Schrittes lagerte sich das Streptavidin an das Biotin der mit Biotin-markierten PCR-Produkte an. Danach wurde die Membran wiederum zwei Mal mit 2x SSPE / 0,5 % SDS für 10 Minuten bei 42 °C im Wasserbad gewaschen um das ungebundene Streptavidin wegzuwaschen. Es folgten zwei Waschschrte mit 2x SSPE unter Raumtemperatur, wodurch das SDS entfernt werden sollte. Jeweils 5 ml Roti Lumin A und B, welche als Substrat dienten, wurden gemischt und die RLB-Membran damit eine Minute inkubiert. Das Substrat wurde durch eine Peroxidase umgesetzt, wobei es lumineszierte. Diese Chemolumineszenz wurde im letzten Schritt detektiert, indem die RLB Membran mit einer ChemoCam fotografiert wurde. Es wurden insgesamt 20 Bilder

geschossen, wobei jeweils ein Bild pro Minute aufgenommen wurde. Die einzelnen Bilder wurden durch das Programm integriert, also übereinandergelegt, sodass zum Schluss ein finales Bild entstand. Dieses Bild wurde daraufhin ausgewertet. Hierfür wurde das Foto in ein Word Dokument hochgeladen und eine Tabelle als Raster über das Bild gelegt, sodass je ein Kästchen der Tabelle das Signalfeld einer Probe umrandete. Dabei dienten die Signale der Positivkontrollen als Orientierungshilfen.

3.4.11.3 "Strippen" der RLB-Membran

Die Wiederverwendung einer RLB Membran ist nach einem Stripp-Vorgang möglich. Dafür wurde die RLB-Membran zwei Mal mit 1 % SDS bei 80 °C für jeweils 30 Min. gewaschen. Dabei lösten sich die Bindung zwischen den PCR-Produkten und den membrangebundenen Oligonukleotiden. Bei Raumtemperatur wurde die RLB-Membran zuletzt mit 20 mM EDTA für 15 Min. gewaschen. Dies wurde durchgeführt, um eventuelles Pilz- oder Bakterienwachstum zu hemmen. Nach diesem Schritt konnte die Membran erneut für die Durchführung eines RLB verwendet oder bei ca. 4 °C in 20 mM EDTA gelagert werden.

3.4.12 PCR für eine anschließende Sequenzierung der PCR-Produkte

Zur Bestätigung positiver Signale im RLB wurden einige Proben für eine Sequenzierung bestimmter Genabschnitte ausgewählt und an GATC Biotech oder LGC Genomics (Berlin) geschickt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Software BLAST = Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.* 1990) im Internet mit Sequenzen anderer Erreger verglichen.

3.4.12.1 PCR des 18S-rRNS Gens der Babesien und Theilerien, des 16S-rRNS Gens der *Rickettsiales* sowie der Region 5S-23S der ribosomalen DNS der Borrelien für eine anschließende Sequenzierung

Zur Durchführung einer PCR Reaktion für eine anschließende Sequenzierung des 18S-rRNS Gens der Babesien und Theilerien, des 16S-rRNS Gens der *Rickettsiales* und der Region 5S-23S der ribosomalen DNS der Borrelien wurden die gleichen Primer und Protokolle für den Thermocycler, wie bei der PCR zur Durchführung eines RLB verwendet (siehe Kapitel 3.4.9).

Für den Ansatz des Mastermixes wurde jedoch die doppelte Menge aller Reagenzien verwendet, wobei zusätzlich noch 2,5 µl H₂O hinzugerechnet wurden, da die Menge der hinzupipettierten DNS bei 2,5 µl blieb. Das Reaktionsvolumen belief sich folglich auf 50 µl (Tab. 13).

Tab. 13: Ansatz des Mastermixes einer PCR Reaktion für eine anschließende Sequenzierung

PCR Mastermix	Zusatz je Probe (µl)
H ₂ O	28,00
MgCl ₂	5,00
Maxima Hot Start Puffer	5,00
Vorwärts Primer	2,00
Rückwärts Primer	2,00
dNTPs	5,00
Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase	0,50
Gesamtvolumen je Probe ohne DNS	47,50
DNS je Probe	2,50

3.4.13 Vorbereitung der PCR-Produkte zur Sequenzierung

Der gesamte Ansatz der PCR-Produkte wurde mit Ladepuffer versehen und auf 1,5 %ige Agarosegele aufgebracht. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte dann wie bereits wie in Kapitel 3.4.10 beschrieben. Im Anschluss wurden die sichtbaren Banden, die der zu erwartenden PCR-Produktgröße entsprachen, mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem "Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit" nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Vor der Entsendung der Proben an die genannten Firmen wurde der Erfolg der Aufreinigung mit dem EPOCH® Biotek Spektralphotometer überprüft, indem die DNS Konzentration gemessen wurde (siehe Kapitel 3.4.7). Eine zusätzliche Kontrolle erfolgte, indem 1 µl der aufgereinigten Proben mit 2 µl Ladepuffer und 9 µl Aqua bidest versetzt und anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt wurden. Letztere erfolgte wie in Kapitel 3.4.10 beschrieben. Die Proben wurden zuletzt auf die von den Firmen angegebene DNS-Konzentration verdünnt und eingeschickt.

3.4.14 Phylogenetische Analyse einer in dieser Studie gefundenen unbekanntes *Anaplasma* sp.

3.4.14.1 PCR des MSP5 Gens der Anaplasmen für eine anschließende Sequenzierung

Um das MSP5 Gen der Anaplasmen zu amplifizieren, wurden die Primer AM - 49F1 und AM - 595R1 (Tab. 8) eingesetzt und der Mastermix wie in Tab. 13 beschrieben zusammengestellt. Für den Thermocycler wurde das "MSP5" Protokoll (Tab. 14) verwendet. Die erwartete Produktgröße lag bei 546 Nukleotiden.

Tab. 14: "MSP5" Protokoll des Thermocyclers zur Amplifizierung des MSP5 Gens der Anaplasmen

Schritt	Beschreibung	Dauer	Temperatur
1.	Schmelzen	4 Min.	95 °C
2.	Schmelzen	20 Sek.	95 °C
3.	Primerhybridisierung	30 Sek.	58 °C
4.	Vervielfältigung	30 Sek.	72 °C
5.	<i>34 Wiederholungen der Schritte 2-4</i>		
6.	Abschließende Vervielfältigungsphase	7 Min.	72 °C

3.4.14.2 PCR des 16S-rRNS Gens der Anaplasmen für eine anschließende Sequenzierung

Zur Amplifizierung des 16S-rRNS Gens der Anaplasmen wurden die Primer Ehr F2 und AnaEhrl full-R (Tab. 8) eingesetzt und ein Mastermix, wie in Tab. 15 beschrieben, erstellt. Der Thermocycler durchlief das Protokoll "16S Gen AnaEhrl" (Tab. 16). Es wurde eine Produktgröße von 1444 Nukleotiden erwartet.

Tab. 15: Ansatz eines Mastermixes für eine PCR Reaktion zur Amplifizierung des 16S-rRNS Gens der Anaplasmen

PCR Mastermix	Zusatz je Probe (µl)
H ₂ O	12,75
Phusion HF-Buffer	5,00
Ehr F2	1,00
AnaEhrl full-R	1,00
dNTPs	2,50
Phusion High-Fidelity Taq Polymerase (2 U/µl)	0,25
Gesamtvolumen je Probe ohne DNS	22,50
DNS je Probe	2,50

Tab. 16: "16S Gen AnaEhrl" Protokoll des Thermocyclers für die PCR des 16S-rRNS Gens der Anaplasmen

Schritt	Beschreibung	Dauer	Temperatur
1.	Schmelzen	60 Sek.	98 °C
2.	Schmelzen	10 Sek.	98 °C
3.	Primerhybridisierung	10 Sek.	61,5 °C
4.	Vervielfältigung	45 Sek.	72 °C
5.	<i>34 Wiederholungen der Schritte 2-4</i>		
6.	Abschließende Vervielfältigungsphase	10 Min.	72 °C

3.4.14.3 PCR des GroEL Gens der Anaplasmen für eine anschließende Sequenzierung

Zur Amplifizierung des GroEL Gens der Anaplasmen wurden die Primer AMgroES111F1 AMgroEL1557R1 (Tab. 8) verwendet und ein Mastermix, wie in Tab. 13 beschrieben, erstellt. Der Thermocycler wurde auf das "GroEL" Protokoll (Tab. 17) eingestellt. Die erwartete Produktgröße lag bei 1446 Nukleotiden.

Tab. 17: "GroEL" Protokoll des Thermocyclers zur Amplifizierung des GroEL Gens der Anaplasmen

Schritt	Beschreibung	Dauer	Temperatur
1.	Schmelzen	4 Min.	95 °C
2.	Schmelzen	20 Sek.	95 °C
3.	Primerhybridisierung	30 Sek.	58 °C
4.	Vervielfältigung	100 Sek.	72 °C
5.	<i>34 Wiederholungen der Schritte 2-4</i>		
6.	Abschließende Vervielfältigungsphase	7 Min.	72 °C

3.4.14.4 Durchführung der phylogenetischen Analyse

Von der Genbank wurden die Nukleinsäuresequenzen der Gene GroEL, MSP5 und 16S von verschiedenen relevanten Anaplasmatataceae heruntergeladen. Die Sequenzen der Gene GroEL und MSP5 wurden auf das Codon Level mit Mega 6 (Tamura *et al.* 2013) angepasst, wobei MUSCLE (Edgar 2004) verwendet wurde. Um die Sequenz des 16S rRNS Gens zu alignen, wurde MAFFT und die Einstellung Q-INS-i verwendet, welche zulässt, dass die Sekundärstruktur der RNS vorhergesagt wird, um die Alignments durchzuführen (Wilm *et al.* 2006; Katoh und Standley 2013).

Die Alignments wurden auf Sättigung überprüft, indem der Test verwendet wurde, der von Xia und Kollegen (Xia *et al.* 2003; Xia und Lemey 2009) beschrieben wurde und in der DAMBE Software (Xia 2013) eingebaut ist. Für die proteinkodierenden Gene wurden diese Tests separat für die Positionen 1 und 2 und die Position 3 der Codons durchgeführt. Die separaten Alignments für die Codonposition 1 und 2 sowie für die Codonposition 3 wurden exportiert und verkettet mit FASConCat (Kück und Longo 2014) und parallel zu einer abgetrennten Datei

für RAxML verarbeitet. Die phylogenetischen Bäume wurden mit dem Programm RAxML 8.2.6 (Stamatakis 2014) auf dem CIPRES Science Gateway Server (Miller *et al.* 2010) mit passenden separaten GTRGAMMA Modellen mit 25 Kategorien für die zwei Programmbereiche errechnet. RAxML wurde mit dem "rapid bootstrapping" Modus mit 1000 Wiederholungen verwendet. Der daraus entstandene Baum wurde als zusätzlicher Input benutzt, um eine feste Baumtopologie für einen zweiten Lauf zu haben, um einen "node support" mit Hilfe des Shimodaira-Hasegawa (SH) likelihood ratio tests (LRT) zu schätzen. Für eine "Multilocus-Analyse" wurden die fünf "Alignments" (zwei für jedes proteinkodierendes Gen und eine für das 16S rRNS Gen) mit FASConCat verknüpft. Ansonsten wurden der Baum und der "node support" in der gleichen Weise wie für die einzelnen Gene berechnet. Alle Bäume wurden mit Mega 6 (Tamura *et al.* 2013) erstellt, wobei für die Wurzeln die non-Anaplasma Sequenzen verwendet wurden.

3.5 Material

3.5.1 Geräte

Tab. 18: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Firma
Stemi DV4 Binokular	Zeiss
Biofuge 13 Zentrifuge	Heraeus Sepatech GmbH, Hanau, Deutschland
Biofuge pico Zentrifuge	Heraeus Sepatech GmbH, Hanau, Deutschland
C1000™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
ChemoCam	Intas, Göttingen, Deutschland
Epoch BioTek® Instrument	BioTek® Instruments, Inc., Winooski, USA
Eppendorf Research Pipetten 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl und 100 - 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
G:Box Geldokumentation	SynGene Europe, Cambridge, UK
GPS Gerät	Hersteller unbekannt; erhalten von Prof. Battsetsag Gonchigoo
HB-1000 Hybridzyzer	UVP, Upland, USA
HI208 Educational pH-Meter	Hanna® Instruments, Woonsocket, USA
IKA® COMBIMAG RCT Magnetrührer	IKA® Works, Inc., Wilmington, USA
IKA® Vortex Genius 3 Vortexer	IKA® Works, Inc., Wilmington, USA
Elektrische Kühlbox	Hersteller unbekannt; erhalten von Prof. Battsetsag Gonchigoo
LE Agarose Pulver	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
LIEBHERR Gefrierschrank	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
LIEBHERR Kühlschranks	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Axiostar Mikroskop	Zeiss
Mikrowelle	Sharp Electronics GmbH, Hamburg, Deutschland

Gerät	Firma
Mini-Blotter 45	Immunetics, Cambridge, USA
Power-Pac™ Universal Power-Supply Netzbetrieb	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Sherman Traps	H.B. Sherman Traps, Inc.
Take 3™ Multi-Volume Plate	BioTek® Instruments, Inc., Winooski, USA
TMix Thermomixer	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Wide Mini-Sub® Cell GT Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
WNE 45 Wasserbad	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland

3.5.2 Laborkits

Tab. 19: Liste der verwendeten Laborkits

Laborkits	Firma
NucleoSpin® Blood Kit	Macherey Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Tissue Kit	Macherey Nagel, Düren, Deutschland
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	ZYMO RESEARCH CORP., Irvine, USA

3.5.3 DNS Polymerasen

Tab. 20: Liste der verwendeten DNS Polymerasen

DNS Polymerase	Firma
Phusion High-Fidelity DNA Polymerases 2 U/μl	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA

3.5.4 Marker

Tab. 21: Liste der verwendeten Marker

Marker	Firma
GeneRuler™ 100 bp Marker	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
GeneRuler™ 1 kb Marker	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
λ EcoRI/HindIII Marker	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA

3.5.5 Chemikalien

Tab. 22: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Firma
Chelex® 100 resin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
DEPC – behandeltes Wasser, Bioscience-Grade, Nuklease frei und autoklaviert	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
dNTP Mix, 10 mM	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
EDAC	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat ≥ 99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
GR Green Nucleic Acid Stain 10.000 × Stock	LABGENE Scientific, Châtel-St-Denis, Schweiz
Indische Tinte	Winsor & Newton, London, England
Methanol	Firma unbekannt, von Prof. Battsetseg Ginchigoo erhalten

Material und Methoden

Chemikalie	Firma
MgCl ₂	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
NaOH Plättchen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Puffertabletten (Puffer nach WEISE)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Roti Lumin A	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti Lumin B	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti [®] Nukleinsäurefrei Spray	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin	Amersham
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-acetat PUFFERAN [®] , ≥ 99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Whatman FTA [®] purification reagent	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
20x SSPE	Invitrogen [™] by Life technologies [™] , Carlsbad, USA
50 × TAE Puffer	Eigene Herstellung
6 × Loading Dye	Eigene Herstellung
70 % Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

3.5.6 Verbrauchsmaterialien

Tab. 23: Liste der Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma
Biodyne® Membran	Pall, NY, USA
Biosphere® Pipettenspitzen mit Filter 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt AG + Co., Nümbrecht, Deutschland
Harris Micro-Punch	Whatman, Clifton, NJ, USA
Venovac Multi-Sample Kanülen 0,9 x 40 mm	Diaprax GmbH
Vakutainer	Becton-Dickinson, Franklin-Lakes, USA
EDTA Blutröhrchen	Becton-Dickinson, Franklin-Lakes, USA
Pasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sammelbehälter Zecken	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Skalpellklingen	Schreiber Instrumente, Fridingen, Deutschland
Objektträger	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Pistille	Bel-Art Scienceware, Pequannock, NJ, USA
Support Cushion (Polsterblatt)	Immunetics, Cambridge, USA
"ERUUL" Vodka (38 %)	APU Company, Ulaanbataar, Mongolei
Whatman FTA® Filtercards	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

3.5.7 Software

Tab. 24: Liste der verwendeten Software

Software	Firma
Software der Chemocam	Intas, Göttingen, Deutschland
BLAST Software	((Altschul <i>et al.</i> 1990)National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA)
Endnote X7	Thomson Reuters, New York, USA
Gen5™ Datenanalyse	BioTek® Instruments, Inc., Winooski, USA
GeneSnap Software (Version 7.09.06)	Syngene Europe, Cambridge, UK
Microsoft Excel 2007 und 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word 2007 und 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA

3.5.8 Herstellung von Lösungen, Puffern und Reagenzien

16 % EDAC

Die Lösung wurde hergestellt, indem 1,6 g EDAC in 10 ml Aqua bidest aufgelöst wurden.

50x TAE Puffer und 0,5 M EDTA

Zur Herstellung des 50x TAE Puffers wurden 242 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-acetat PUFFERAN[®], $\geq 99\%$ abgewogen und in einen 1000 ml Erlenmeyerkolben gegeben. Anschließend wurden 100 ml einer 0,5 M EDTA Lösung sowie 57,1 ml Eisessig hinzupipettiert und der Kolben auf 1000 ml mit Aqua bidest aufgefüllt. Anschließend wurde der Kolben mit einem Magnetrührer versehen und auf eine Rührplatte gestellt bis sich das gesamte TRIS Pulver aufgelöst hatte. Um das 0,5 M EDTA herzustellen wurden 186,1 g Dinatriumsalz Dihydrat $\geq 99\%$ auf einer Waage abgewogen und 800 ml Aqua bidest dazugegeben. Darauf wurde mit Hilfe eines pH Meters der pH Wert mit NaOH Plättchen auf 8,0 eingestellt.

SDS 10 %

Für die Herstellung einer 10 %igen SDS Lösung wurden 100 g SDS (ultrapure 99,5 %) in 1000 ml Aqua bidest gelöst. Zur Herstellung einer 1 %igen Lösung wurde die 10 %ige SDS Lösung im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest verdünnt.

2x SSPE / 0,1 % SDS

Es wurden 100 ml 1 % SDS und 800 ml Aqua bidest gemischt und anschließend 100 ml 20x SSPE hinzugegeben.

2x SSPE / 0,5 % SDS

Es wurden 50 ml 10 % SDS mit 850 ml Aqua bidest gemischt und anschließend 100 ml 20x SSPE hinzugefügt.

4 Ergebnisse

4.1 Zecken

4.1.1 Adulte Zecken aus der Vegetation

4.1.1.1 Entomologische Untersuchung der adulten Zecken aus der Vegetation

Aus der Vegetation mit einem Flanelltuch und von den Jurten der Nomaden konnten in den 6 untersuchten Somonen 310 adulte ungesogene Zecken gesammelt werden. Von diesen waren 169 männlich und 141 weiblich. Die Zahl der gesammelten Zecken in den einzelnen Somonen variierte stark zwischen 4 Zecken in Tsenkhermandal und 118 Zecken in Delgerchaan (Tab. 25). Alle aus der Vegetation gesammelten Zecken konnten der Art *Dermacentor nuttalli* (Abb. 11; Abb. 12; Abb. 13; Abb. 14) zugeordnet werden.

4.1.1.2 RLB-Untersuchung der adulten Zecken aus der Vegetation

Die RLB Untersuchungen zeigten das Vorhandensein der DNS von *Theileria orientalis*, *Theileria equi*, *Babesia caballi*, *Rickettsia raoultii*, *Bor. afzelii*, *Midichloria* sp. und *Neoerhlichia* sp. (Tab. 26).

Für den Nachweis einer uncharakterisierten *Anaplasma* sp., die bei der Untersuchung mit dem RLB nur ein "Catch-all" Signal zeigte, wurden empirisch neue RLB-Sonden entwickelt (siehe Kapitel 4.2). Nach den RLB Untersuchungen waren insgesamt 26 der 310 adulten *D. nuttalli* Zecken mit der unbekanntenen *Anaplasma* sp. infiziert.



Abb. 11: Männliche adulte *Dermacentor nuttalli* Zecke von dorsal



Abb. 12: Männliche adulte *Dermacentor nuttalli* Zecke von ventral



Abb. 13: Weibliche adulte *Dermacentor nuttalli* Zecken von dorsal



Abb. 14: Weibliche adulte *Dermacentor nuttalli* Zecken von ventral

Tab. 25: Anzahl der gesammelten Zecken aus der Vegetation mit Fundort und Geschlecht

Anzahl gesammelter Zecken aus der Vegetation							
	Delgerchaan	Tsenkhermandal	Dschargaltchaan	Binder	Dadal	Bajan-Adarga	Gesamt
Männliche Zecken	67	3	17	34	1	47	169
Weibliche Zecken	51	1	18	43	4	24	141
Gesamt	118	4	35	77	5	71	310

Tab. 26: Ergebnisse der RLB Untersuchung von 310 adulten Zecken aus der Vegetation

RLB-Sonden	Anzahl positiver Signale der untersuchten Zecken einzener Somone						
	Delgerchaan (118)	Tsenkhermandal (4)	Dschargaltchaan (35)	Binder (77)	Dadal (5)	Bajan-Adarga (71)	Gesamt (310)
Bacteria catch-all	118	4	35	77	5	69	308 (99,4 %)
<i>Anaplasma/Ehrlichia</i> catch-all	89	3	32	64	4	61	253 (81,6 %)
<i>A. mongolia</i> 2 ¹	19	0	2	0	0	5	26 (8,4 %)
<i>Theileria/Babesia</i> catch-all	13	1	6	12	1	14	47 (15,2 %)
<i>Babesia</i> catch-all 2	3	1	3	4	0	0	11 (3,5 %)
<i>B. caballi</i>	1	0	0	1	0	3	5 (1,6 %)
<i>T. equi</i> A1	0	0	0	0	0	2	2 (0,6 %)
<i>T. equi</i> A2	0	0	4	1	0	9	14 (4,5 %)
<i>Midichloria</i> catch-all	15	0	2	0	0	1	18 (5,8 %)
<i>Neoehrlichia</i> catch-all	1	0	0	0	0	0	1 (0,3 %)
<i>Neoehrlichia mikurensis</i>	1	0	0	0	0	0	1 (0,3 %)
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	1	0	0	0	0	0	1 (0,3 %)
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. 2	1	0	0	0	0	0	1 (0,3 %)
<i>Bor. afzelii</i>	1	0	0	0	0	0	1 (0,3 %)
<i>Rickettsia</i> catch-all	82	4	33	64	4	56	243 (78,4 %)
<i>Rickettsia raoultii</i>	88	4	34	65	4	57	252 (81,3 %)

¹Die Sonde "*A. mongolia* 2" konnte empirisch als die sicherste Sonde für den Nachweis der gefundenen *Anaplasma* sp. ermittelt werden.

4.1.2 Adulte Zecken von Rindern

4.1.2.1 Entomologische Untersuchung der adulten Zecken von Rindern

Von den 481 untersuchten Rindern konnten insgesamt 2318 Zecken abgesammelt werden. Von diesen waren 778 männlich und 1540 weiblich (Tab. 27). Die Anzahl der von Rindern gesammelten Zecken variierte zwischen 281 in Bajan-Adarga und 465 in Binder (Tab. 27). Alle von Rindern gesammelten Zecken konnten der Art *Dermacentor nuttalli* zugeordnet werden und wurden nicht weiter auf Pathogene untersucht.

Tab. 27: Anzahl der gesammelten Zecken von Rindern mit Fundort und Geschlecht

Anzahl gesammelter Zecken von Rindern							
	Delgerchaan	Dschargaltchaan	Tsenkhermandal	Binder	Dadal	Bajan-Adarga	Gesamt
Männliche Zecken	67	167	129	208	112	95	778
Weibliche Zecken	281	271	329	257	216	186	1540
Gesamt	348	438	458	465	328	281	2318

4.1.3 Juvenile Zeckenstadien

4.1.3.1 Bestimmung der Art der juvenilen Zeckenstadien

249 Zeckenlarven von 23 Nagern, die nicht weiter einer Art zugeordnet wurden, wurden aus den zwei Somonen Bajan-Adarga und Dschargaltchan gesammelt (Tab. 28). Auf einem weiteren gefangenen Nager fanden sich keine juvenilen Zeckenstadien. Von den gesammelten Zeckenlarven waren 49 beschädigt und 200 unbeschädigt. Die beschädigten wurden aussortiert. Alle unbeschädigten Zeckenlarven zeigten morphologisch die gleichen Hauptmerkmale (Abb. 15; Abb. 16). Von den 200 unbeschädigten Zeckenlarven wurden drei Exemplare für die Sammlung des Instituts für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin und zur Fotografie zurückbehalten, wonach 197 weiter molekularbiologisch untersucht wurden. Die Zeckenlarven wurden zu Pools (n = 28) zusammengefasst. Hierfür wurden fünf zufällig ausgewählte Zeckenlarven sowie drei Zeckenlarven von jeweils einem Nager einzeln untersucht. Die restlichen unbeschädigten Zeckenlarven (n = 189) von jeweils einem Nager wurden zu einem Pool zusammengefasst. Die acht Zeckenlarven aus denen die DNS einzeln extrahiert wurde, wurden zur molekularbiologischen Identifikation herangezogen. Die ITS2 Region stimmte für 100 % mit der *D. nuttalli* ITS2 Sequenz aus Sibirien (KF241874) beim Blasten überein.

Tab. 28: Anzahl der untersuchten Nager und die Anzahl der auf diesen gefundenen Zeckenlarven mit Fundort

	Somone		Gesamt
	Bajan-Adarga	Dschargaltchan	
Nager	10	14	24
Zeckenlarven	56	193	249

4.1.3.2 RLB-Untersuchung der juvenilen Zeckenstadien

In der RLB Untersuchung der 28 Pools konnte die DNS von *Rickettsia raoultii* und *Midichloria* gefunden werden (Tab. 29).

Tab. 29: Ergebnisse der RLB Untersuchung von 28 gepoolten Proben aus 197 Zeckenlarven

RLB-Sonden	Anzahl positiver Signale		
	Dschargaltchan (17)	Bajan-Adarga (11)	Gesamt (28)
Bacteria catch-all	17	11	28 (100 %)
<i>Anaplasma/Ehrlichia</i> catch-all	15	10	25 (89,3 %)
<i>Midichloria</i> catch-all	1	1	2 (7,1 %)
<i>Rickettsia</i> catch-all	15	9	24 (67,2 %)
<i>Rickettsia raoultii</i>	16	11	27 (96,4 %)



Abb. 15: *Dermacentor nuttalli* Zeckenlarve von dorsal



Abb. 16: *Dermacentor nuttalli* Zeckenlarve von ventral

4.2 Blutproben

Es wurden 481 Rinderblutproben von 61 Nomadenherden gewonnen, wobei je Herde 8 Rinder, sofern dies möglich war, beprobt wurden. Waren nicht ausreichend Rinder vorhanden, wurden in der nächste Herde entsprechend mehr Tiere beprobt. Die Anzahl der Blutproben je Somon sollte bei 80 liegen. In Delgerchaan wurde auf 2 Blutproben verzichtet, da die letzte Herde zu klein war. Die 2 Blutproben wurden aus logistischen Gründen in der nächsten Herde in Tsenkhermandal nachgeholt. Die beprobten Rinder waren allesamt heimische Rinder und hatten in der Regel ein Alter zwischen ein bis drei Jahren, wobei einzelne Tiere älter waren.

4.2.1 RLB Untersuchung der Blutproben

In der RLB Untersuchung zeigten einige Proben ein positives Signal für die "Anaplasma/Ehrlichia catch-all" Sonde ohne ein speziesspezifisches Signal. Daher wurden die Proben B220 und B251 zur Sequenzierung des 16S Gens ribosomalen RNS ausgewählt. Beim Blasten der erhaltenen Gensequenz zeigte sich nur eine 99,3 %ige Übereinstimmung zu einer vorhandenen *Anaplasma ovis* Sequenz (Accession number: AF318945). Darauf wurde empirisch versucht eine RLB-Sonde für die neu erhaltene Anaplamensequenz zu entwickeln. Es wurden 4 RLB-Sonden (*A. mongolia*, *A. mongolia 2*, *A. mongolia 3*, *A. mongolia 4*) designt und überprüft. Die entwickelten RLB-Sonden zeigten unterschiedlich viele positive Signale, wobei die RLB-Sonde "*A. mongolia 2*" mit 153 die meisten und die RLB-Sonde "*A. mongolia 3*" mit 137 die wenigsten positiven Signale lieferte, wenn man *A. mongolia* nicht mit einbezieht, da diese nicht funktionierte (Tab. 30). Es traten 4 unterschiedliche RLB-Sondenkombinationen auf. So war entweder nur die RLB-Sonde "*A. mongolia 2*" (n = 12) oder die RLB-Sonden "*A. mongolia 2*" und "*A. mongolia 4*" (n = 4) oder die RLB-Sonden "*A. mongolia 2*", "*A. mongolia 3*" und "*A. mongolia 4*" (n = 136) oder nur die RLB-Sonde "*A. mongolia 3*" (n = 1) positiv. Es zeigte sich keine Anaplasmen DNS bei der überprüfenden Sequenzierung, wenn alleine die RLB-Sonde "*A. mongolia 3*" positiv war. Bei den anderen Kombinationen konnte jeweils *Anaplasma* DNS einer *A. ovis* ähnlichen Anaplasmenart sequenziert werden. Die empirischen Untersuchungen zeigten, dass die Sonde "*A. mongolia 2*" am besten für einen Nachweis der unbekanntes *Anaplasma* sp. geeignet war und somit insgesamt 153 Rinder infiziert waren.

Tab. 30: Ergebnisse der RLB Untersuchung der Blutproben der Rinder

RLB Sonden (Oligonukleotide)	Anzahl positiver Signale nach Somonen des Aimags Khentii						
	Delgerchaan (78)	Tsenkhermandal (82)	Dschargaltchaan (80)	Binder (80)	Dadal (80)	Bajan-Adarga (81)	Gesamt (481)
Bacteria catch-all	46	39	61	46	46	66	304 (63,2 %)
<i>Anaplasma/Ehrlichia</i> catch-all	31	27	40	22	9	24	153 (31,8 %)
<i>A. mongolia</i> 2 ¹	30	27	40	22	9	25	153 (31,8 %)
<i>A. mongolia</i> 3	30	14	40	22	8	23	137 (28,5%)
<i>A. mongolia</i> 4	30	14	40	22	9	25	140 (29,1%)

¹Die Sonde "*A. mongolia* 2" konnte empirisch als die sicherste Sonde für den Nachweis der gefundenen *Anaplasma* sp. ermittelt werden.

4.3 Phylogenetische Analyse der in dieser Studie gefundenen uncharakterisierten *Anaplasma* sp.

In dieser Studie wurde im Rahmen der PCR basierten RLB Untersuchung in Rindern und Zecken der Art *D. nuttalli* eine *Anaplasma* sp. gefunden, die von der Basensequenz von den bisher bekannten Anaplasmen Arten abwich und mit verwendeten speziesspezifischen RLB-Sonden nicht nachzuweisen war. Um die gefundene *Anaplasma* sp. phylogentisch näher einordnen zu können, wurden die Gensequenzen der Gene GroEL, MSP5 und das 16S rRNS Gen für eine phylogentische Analyse verwendet. Diese zeigte, dass die gefundene *Anaplasma* sp. am nächsten mit *Anaplasma ovis* verwandt ist (Abb. 17).

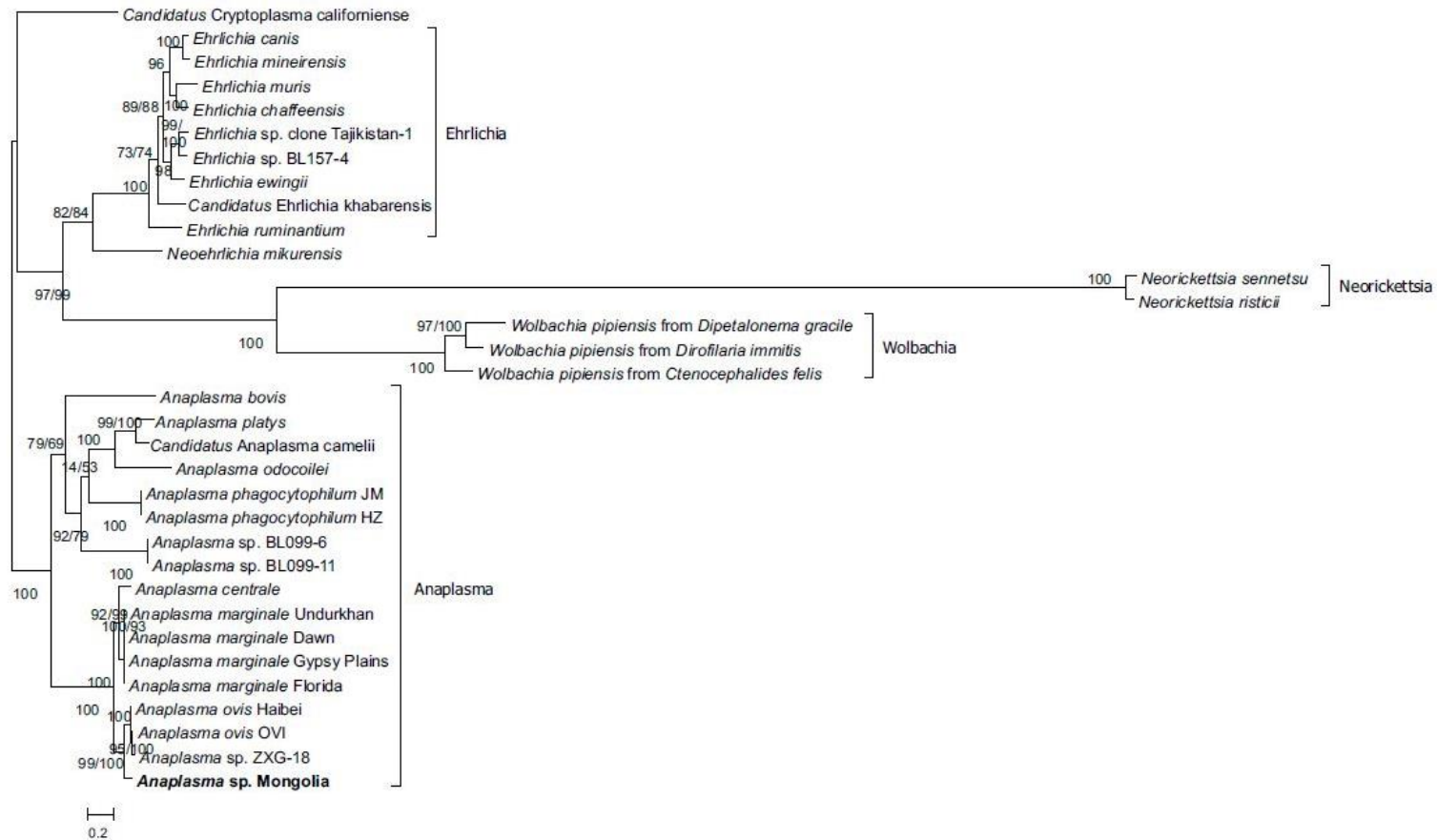


Abb. 17: Phylogenetische Analyse von Anaplasmataceae mit der "Maximum-likelihood" Methode

(Für die phylogenetische Analyse wurde eine multi-lokus Analyse basierend auf den Gensequenzen von GroEL, MSP5 und 16S verwendet. Die Sequenzen von den anderen Genera in der Familie der Anaplasmataceae wurden verwendet und dienen als "outgroup". Die Nummern vor und nach dem Slash repräsentieren "node support" Werte, die im Nachhinein von dem "Shimodaira-Hasegawa likelihood ratio test" und "bootstrapping" erhalten wurden. Die Skala stellt 0,2 Substitutionen pro Seite dar. Das Bakterium, dessen Sequenz in dieser Studie erhalten wurde, ist fett gedruckt. Die GenBank accession numbers für alle Sequenzen sind in der Tab. 31 dargestellt.)

Tab. 31: Liste der für die phylogenetische Analyse verwendeten Anaplasmataceae mit GenBank accession numbers

Spezies	Genom	GroEL	16S rRNA	MSP5
<i>Anaplasma</i> sp. BL099-11		KJ410300	KJ410248	
<i>Anaplasma</i> sp. BL099-6		KJ410301	KJ410247	
<i>Anaplasma bovis</i>		JN588562	GU937020	
<i>Anaplasma centrale</i>	CP001759			
<i>Anaplasma marginale</i> Dawn	CP006847			
<i>Anaplasma marginale</i> Florida	CP001079			
<i>Anaplasma marginale</i> Gypsy Plains	CP006846			
<i>Anaplasma marginale</i> Undurkhan		JQ735902	JQ735904	AB703240
<i>Anaplasma odocoilei</i>		JX876642	JX876644	
<i>Anaplasma ovis</i> Haibei	CP007596			
<i>Anaplasma ovis</i> OVI		AF441131	AF414870	
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> HZ	CP000235			
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> JM	Cp006617			
<i>Anaplasma platys</i>		AY077621	AY077619	
Candidatus <i>Anaplasma camelii</i>		KJ814956	KF843824	
Candidatus <i>Cryptoplasma californiense</i>		KP276602	KP276587	
Candidatus <i>Ehrlichia khabarensis</i>		KR063139	KR063138	
<i>Ehrlichia</i> sp. BL157-4		JX402612	KJ410255	
<i>Ehrlichia canis</i>	CP000107			
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	CP000236			
<i>Ehrlichia ewingii</i>		AF195273	M73227	
<i>Ehrlichia mineirensis</i>		JX629806	JX629805	
<i>Ehrlichia muris</i>	CP006917			
<i>Ehrlichia ruminantium</i>	NC_005295.2			

Ergebnisse

Spezies	Genom	GroEL	16S rRNA	MSP5
<i>Ehrlichia</i> sp. clone Tajikistan-1		KJ930191	KM995818	
<i>Neoehrlichia mikurensis</i>		KU865477	KU865475	
<i>Neorickettsia risticii</i>	CP001431			
<i>Neorickettsia sennetsu</i>	CP000237			
Uncultured <i>Anaplasma</i> sp. ZXG-18		JX898991	JX898992	
<i>Wolbachia pipientis</i> Endosymbiont von <i>D. immitis</i>		AJ558023	Z49261	
<i>Wolbachia pipientis</i> von <i>C. felis</i>		AJ609659	AJ628416	
<i>Wolbachia pipientis</i> von <i>D. gracile</i>		AJ609658	AJ548802	

4.4 Fragebogenauswertung

Die meisten Herden befanden sich in einer Steppenregion (n = 46) und deutlich weniger in einer Waldsteppe (n = 15). Die Nomaden gaben bei der Befragung an, dass ihre Tiere gesund seien. Nur eine Kuh lag fest und wurde euthanasiert. Kein Tierhalter berichtete von Hämoglobinurie, einer erhöhten Mortalität oder von anderen Anzeichen einer Erkrankung einer bovinen Babesiose, Theileriose oder Anaplasiose. Lediglich in einer Herde waren 20 Aborte aufgetreten. In einer weiteren Herde berichtete ein Tierhalter von 2 Rindern, die "müde" seien. 7 Herden wurden laut der Besitzer mit Ivermectin behandelt. 17 Herden wurden gegen Maul- und Klauenseuche (MKS) geimpft, 5 Herden gegen MKS und *Bacillus anthracis* (Milzbrand) und der Besitzer einer Herde konnte keine Auskunft darüber geben, wogegen seine Rinder geimpft worden waren.

5 Diskussion

5.1 Fragestellung

In dieser Studie sollte das Auftreten der eher in tropischen Regionen vorkommenden durch Zecken übertragbaren Erreger *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Theileria orientalis* sowie *Anaplasma marginale* in der Mongolei näher untersucht werden. Hierbei lag das Augenmerk insbesondere auf der Frage, durch welche Vektoren *B. bovis*, *B. bigemina* und *A. marginale* in der Mongolei übertragen werden könnten, da die Präsenz der bekannten Vektorzeckenarten in der Mongolei bisher nicht beschrieben wurde. *Theileria orientalis* war bereits in Zecken der Art *D. nuttalli* nachgewiesen worden, die als möglicher Vektor für *T. orientalis* in Frage kommt.

Ein weiteres Ziel der Studie lag darin, zu untersuchen, wie weit der mongolische Rinderbestand in dem Aimag Khentii, einer Region, in der die gesuchten Erreger erstmalig im Zeitraum 2010-2013 beschrieben wurden (AbouLaila *et al.* 2010; Altangerel *et al.* 2011; Sivakumar *et al.* 2012; Ybanez *et al.* 2013), bereits infiziert ist. Dies erschien sinnvoll, da vor allem im Fall des Auftretens der benannten *Babesia* spp. mit einer schnellen Durchseuchung des Rinderbestandes zu rechnen war (de Vos und Potgieter 1994). Die gewonnenen Erkenntnisse sollten die Basis für eine eventuelle Interventionsstrategie sein, um eine mögliche weitere Ausbreitung der Erreger und ihrer Vektoren zu verhindern.

Darüber hinaus sollte die Studie einen Überblick darüber verschaffen, ob weitere bisher noch nicht bekannte durch Zecken übertragbare Krankheitserreger in der Rinder- und Zeckenpopulation in Khentii vorhanden sind.

5.2 Besprechung der Methoden

5.2.1 Auswahl der Studienregion

Das Aimag Khentii als Untersuchungsregion auszuwählen, hatte zum einen den Vorteil, dass die gesuchten Erreger in diesem Aimag und den untersuchten Somenen bereits nachgewiesen wurden (AbouLaila *et al.* 2010; Altangerel *et al.* 2011; Sivakumar *et al.* 2012; Ybanez *et al.*

2013) und so die Wahrscheinlichkeit dieselben und ihre Vektoren dort anzutreffen erhöhte. Zum anderen ist das Aimagzentrum Öndörchaan von Ulaanbaatar, welches das Zentrum der Mongolei darstellt, in wenigen Stunden mit dem Auto über eine asphaltierte Straße zu erreichen. Diese ist jedoch nur eine der wenigen asphaltierten Straßen in Khentii. Der Rest des "Straßennetzes" besteht aus Feldwegen. So lag ein weiterer Vorteil, Khentii als Studienregion auszuwählen, darin, dass die Landschaft in den mittleren und südlichen Regionen relativ flach ist. Deshalb war kein Geländewagen, wie es in anderen Regionen der Fall gewesen wäre, erforderlich. Die Somone Tsenkhermandal, Dschargaltchaan und Delgerchaan wurden ausgewählt, da hier besonders die Steppe als Landschaftsform dominiert, was eine relativ unproblematische Fortbewegung zwischen den ausgewählten Tierherden versprach. Die weiteren Zielregionen Binder, Dadal und Bajan-Adarga bieten eher das Landschaftsbild einer Waldsteppe und weniger einer Gebirgstaiga oder eines Hochgebirges, wie es in anderen nördlichen Somonen Khentii's der Fall gewesen wäre, was wiederum die Fortbewegung hätte erschweren können. Die Geographie der ausgewählten Somone hat den weiteren Vorteil, dass in den so abgedeckten 2-3 Vegetationszonen nach Dash (1986) mit dem Auftreten verschiedener Zeckenarten zu rechnen war, die als potentielle Vektoren der gesuchten Erreger hätten in Frage kommen können.

5.2.2 Wahl des Studienzeitraums

Für die Wahl des Studienzeitraums mussten verschiedene Faktoren bedacht werden. Hierbei spielten vor allem das zeitliche Auftreten der Zecken in der Mongolei sowie der Zeitraum der zu erwartenden Parasitämie der gesuchten Pathogene eine Rolle.

Typisch für die Mongolei ist eine eingipflige Saisonaktivität der Zecken, wobei sich die Aktivitätsperioden nach Zeckenart und Region unterscheiden. Allgemein kann man sagen, dass das Auftreten der ersten adulten Zecken im Frühling ab März beobachtet wird und bis Ende Juni dauert. Nach diesem Zeitraum sind kaum noch adulte Zecken zu finden. Dafür treten von Mai bis September juvenile Zeckenstadien auf Nagern mit einem Höhepunkt im Juli und August auf (Dash 1988).

Für den Untersuchungszeitraum wurden daher die Monate Mai bis Juli ausgewählt, da in dieser Zeit mit dem Auftreten aller Zeckenstadien zu rechnen war. Ein weiterer Grund erst im Mai mit der Studie zu beginnen, obwohl zu dieser Zeit der Zenit der Präsenz der adulten Zecken bereits

überschritten war, lag an der Vermeidung der in den Monaten März und April immer noch frostigen Temperaturen, die eine Beprobung der Rinder und Beflagung der Vegetation deutlich hätten erschweren können.

Die Entwicklungsphysiologie der zu erwartenden Pathogene sprach ebenfalls für den ausgewählten Zeitraum.

Die gesuchten *Babesia* spp. besitzen je nach Art eine Präpatenzzeit von ca. 6-18 Tagen. 3-5 Tage später ist die Parasitämie in den infizierten Rindern am höchsten, was die Wahrscheinlichkeit eines positiven Nachweises der Erreger erheblich erhöht (Bock *et al.* 2004). Wenn man davon ausgeht, dass erst im April der Zeckenbefall bei Rindern besonders stark ausgeprägt ist und die Babesien in dieser Zeit übertragen werden, rechnet man demnach 9-23 Tage später, also Ende April bis Mitte Mai, mit dem Auftreten der stärksten Parasitämie bei neu infizierten Rindern.

A. marginale hat eine Inkubationszeit von 7 bis 60 Tagen (Kocan *et al.* 2003) und würde demnach ebenfalls zu dieser Zeit nachweisbar sein wie auch *T. orientalis*, welche 10 Tage nach der Inokulation im Blut nachgewiesen werden kann (Watts *et al.* 2016).

In den zugrundeliegenden Referenzen, die das Auftreten der gesuchten Erreger in der Mongolei beschrieben, standen keine Angaben zum jeweilige Studienzeitraum, welche als weitere Grundlage für die Auswahl des Zeitraumes dieser Studie hätte dienen können.

5.2.3 Zeckensammlung

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Zeckenstadien aus der Vegetation und von Rindern sowie Nagern gesammelt, um mögliche bekannte Vektorzecken der gesuchten Erreger (siehe Kapitel 2.5) zu finden. Zudem sollten die gesammelten Zecken auf Pathogene untersucht werden, wodurch Rückschlüsse auf mögliche Übertragungswege derselben gezogen werden sollten.

Um Zecken aus der Vegetation zu sammeln, gibt es verschiedene Methoden, die sich in konventionelle und neue Methoden einteilen lassen. Zu den konventionellen Methoden gehören das Flaggen, das "dragging", das "dry ice trapping", das "sweep netting" und das Ablaufen mit anschließenden Absammeln der Zecken von den Kleidern. Zu den neueren Methoden zählen das "CO₂ dragging" und "CO₂ flagging" (Ginsberg und Ewing 1989; Mays *et al.* 2016). Bei der Suche nach unterschiedlichen Zeckenarten ist der Einsatz verschiedener Methoden effektiver,

um ein repräsentatives Bild der vorhandenen Zeckenpopulation zu erhalten (Rynkiewicz und Clay 2014). Im Grasland unterscheiden sich jedoch die Methoden von ihrer Effizienz her wenig (Mays *et al.* 2016). Da in den Zielregionen vor allem Grasland zu erwarten war, wurde die unkomplizierte und dennoch effektive Methode des Flaggens mit einem Flanelltuch zur Sammlung der Zecken aus der Vegetation gewählt. Dadurch wurden eventuelle logistische Probleme umgangen, die der Einsatz von Trockeneis oder anderen komplexen Methoden mit sich gebracht hätte.

Die Sammlung von adulten Zecken direkt von Rindern ist ebenfalls eine Methode, die bereits in vielen Studien eingesetzt wurde (Oliveira *et al.* 2008; Sarani *et al.* 2014).

Der Zeckenbefall von Rindern in der Mongolei ist während deren Aktivitätsperiode intensiv. Dash (1988) fand bei seinen Untersuchungen in der Waldsteppe im Mittel 1492 *D. nuttalli* Zecken auf Rindern und 1006 auf Pferden. Alle Zecken von einem Rind abzusammeln wäre aus zeitlichen Gründen nicht möglich gewesen. Deshalb wurden die beprobten Tiere nach mindestens fünf adulten Zecken abgesucht. Dass auf einigen Rindern keine Zecken gefunden werden konnten, lag wahrscheinlich daran, dass es in einigen Gegenden generell wenige Zecken gibt und dass die Zeckensaison bereits vorangeschritten war (Dash 1988).

Juvenile Zeckenstadien befinden sich in der Mongolei bevorzugt auf Nagern (Daš *et al.* 1989). Um Rückschlüsse auf eine mögliche vertikale Übertragung von Erregern in den Zecken ziehen zu können, wurden Nager gefangen und alle vorhandenen juvenilen Zeckenstadien abgesammelt. Hierbei wurden nur die Somone Bajan-Adarga und Dschargaltchan, die jeweils repräsentativ für eine Vegetationszone standen, als Zielregionen ausgewählt. Aus zeitlichen Gründen war es nicht möglich, Nager in weiteren Somonen zu beproben. Aus den gleichen Gründen musste auch auf eine Ausgrabungen der Nagerbauten zur Sammlung von Zeckenstadien, wie sie Logan *et al.* (1993) beschreibt, verzichtet werden.

Die Lagerung der Zecken in Alkohol (70 %) zur Konservierung der darin enthaltenen DNS ist eine erprobte Methode, um anschließend eine PCR Reaktion durchzuführen (Mtambo *et al.* 2006). Das vorübergehende Einlegen der Zecken in Vodka war dadurch zu erklären, dass sich nur sehr wenig 70 %- oder höherprozentiger Alkohol in der Mongolei vor Beginn der Studie beschaffen ließ. Eine Einfuhr von 70 %igem Alkohol mit dem Flugzeug aus Deutschland war aus Flugsicherheitsgründen nicht erlaubt. Daher wurde der in entlegenen Gebieten relativ

günstig zu erwerbende "Eruul" Vodka (38 %) als Ersatz verwendet, bis alle Zecken in Deutschland in 70 %igen Alkohol eingelegt werden konnten. Die anschließenden molekularbiologischen Untersuchungen der in Vodka eingelegten Zecken verliefen im Anschluss ohne Probleme.

5.2.4 Zeckenidentifikation

Die Morphologie der Zecken steht bei der Identifikation deren Art heute immer noch als Grundlage im Vordergrund, auch wenn es immer mehr molekularbiologische Methoden zur Einteilung der Zeckenarten gibt (Estrada-Pena *et al.* 2013).

Die Identifikation der Zecken erfolgte bei den adulten Zecken allein durch morphologische Merkmale auf Grundlage der Beschreibung von (Sondermann 1993).

Für die morphologische Identifizierung der Zeckenlarven gab es in der Literatur nur unzureichende Angaben. Die Zeckenlarven sollten deshalb nach einer morphologischen Begutachtung in ähnlich aussehende Gruppen eingeteilt werden, die jedoch keine Unterschiede erkennen ließ. Von 10 zufällig ausgewählten Zeckenlarven wurde im Anschluss die ITS2 Region sequenziert, welche eine Identifikation der Zecken auf molekularbiologischer Grundlage ermöglicht (Kulakova *et al.* 2014). Da alle Gensequenzen der 10 Zeckenlarven vollständig mit bereits vorhandenen Gensequenzen von *D. nuttalli* übereinstimmten, wurde davon ausgegangen, dass die restlichen Zeckenlarven ebenfalls dieser Art angehören, da keine morphologischen Unterschiede zu den untersuchten Zeckenlarven erkennbar waren.

5.2.5 Auswahl der Herden und Rinder

Auf Basis der vorangegangenen Untersuchungen und den erhaltenen Tierzahlen von Prof. Battsetseg Gonchigoo mussten nach Fosgate (2009) mindestens 58 Rinder untersucht werden, um einen Erreger in der untersuchten Population nachweisen zu können, wenn man von einem perfekten Test ausgeht. Da letzteres nicht der Fall ist, wurden 80 Rinder pro Somon in die Untersuchung einbezogen. Eine direkte Prävalenz der Erreger in der gesamten Population zu ermitteln, hätte den zeitlichen und finanziellen Rahmen dieser Studie gesprengt.

Da die Tierherden in der Steppe teilweise schwer zu finden sind, wurden mit der Hilfe der lokalen Veterinäre in jedem Somon 10 Herden per Zufall ausgewählt, wobei einige Herden

aufgrund zu großer Distanz oder schwieriger Erreichbarkeit mit dem Auto von der möglichen Auswahl ausgeschlossen waren. Hatte eine ausgesuchte Nomadenherde keine Rinder wurden stattdessen die Rinder der Nachbarherde in die Untersuchung einbezogen. Von den ausgewählten Herden wurden jeweils 8 ein- bis dreijährige Rinder zufällig zur Beprobung ausgesucht. Da die meisten Rinder tagsüber in der Steppe grasten, war die Mithilfe der Nomaden erforderlich, welche die Tiere in Pferche trieben, in denen sie leichter eingefangen werden konnten. Waren keine Pferche vorhanden, wurden die Rinder von den Nomaden einzeln eingefangen. Das Alter der Rinder war schwer zu überprüfen, da eine Zahnaltersbestimmung sehr zeitaufwendig gewesen wäre. Da die Tiere manuell fixiert werden mussten, wurde ein größerer Wert auf die Blut- und Zeckenproben gelegt. Die Tiere sollten zudem so wenig wie möglich gestresst werden, um sie zu schonen und deren Eigentümer nicht zu verärgern. Daher wurde das Alter der untersuchten Rinder von den Herdenbesitzern erfragt. Einzelne Tiere wichen vom Alter her ab, wurden aber trotzdem beprobt.

Die Wahrscheinlichkeit des Nachweises einer Babesieninfektion bei ein- bis dreijährigen Rindern ist vermutlich höher als bei Rindern einer anderen Altersklasse. Die einjährigen Rinder haben die Zeckensaison bereits mitgemacht und können daher bereits mit den Erregern infiziert sein. Sie sind empfänglicher für eine Infektion mit Babesien als Kälber, die bis zum 9. Monat nur eine milde Verlaufsform der bovinen Babesiose zeigen (Bock *et al.* 2004). Rinder, die älter sind als 3 Jahre haben häufig schon eine Infektion durchgemacht, weshalb sie zwar persistent infiziert sein können, aber nur eine niedrige Parasitämie aufweisen, die in der akuten Krankheitsphase in der Regel viel stärker ausgeprägt ist (Bock *et al.* 2004). Die genannte Altersgruppe wurde daher zur Beprobung ausgewählt. Alle Nomaden stellten ihre Rinder zur Verfügung und unterstützten die Beprobung teilweise tatkräftig. Das lag unter anderem daran, dass den Nomaden die lokalen mongolischen Veterinäre, die uns begleiteten, bekannt waren. Zudem wurde den Nomaden der Grund und die Art der Untersuchung im Voraus erklärt, um eventuelle Bedenken aus dem Weg zu räumen.

5.2.6 Blutproben

Die zu beprobenden Rinder wurden eingefangen und für die Dauer der Blutentnahme und des Absuchens auf Zecken manuell im Stehen fixiert. Gelang eine Ruhigstellung der Tiere im Stehen nur ungenügend, wurde versucht sie auf die Seite zu legen. Aufgrund des Fehlens von

Fressgittern oder Zwangsständen war dies die einzige Möglichkeit um an die Tiere heranzukommen. Die Blutentnahme erfolgte aus der *Vena jugularis*.

Eine sichere Stromversorgung gibt es außerhalb von Ulaanbaatar nur in den Zentren der Aimags und Somone. Eine zentrale Frage zur Durchführung der Studie bestand in der Umsetzung der Kühlung der Blutproben, da sich die Herden weit ab von einer Stromversorgung befanden. Eine Möglichkeit Blutproben ungekühlt zu lagern und diese im Anschluss auf Pathogene zu untersuchen besteht in der Verwendung von Whatman FTA[®] Filtercards (Ahmed *et al.* 2011). Zudem werden mögliche Pathogene beim Aufbringen auf die Whatman FTA[®] Filtercards inaktiviert, was einen sicheren Transport ermöglicht (Abdelwhab *et al.* 2011). Die gewonnenen Vollblutproben wurden daher zur Sicherheit möglichst zeitnah nach der Blutabnahme auf Whatman FTA[®] Filtercards aufgebracht, um einem eventuellen Verlust der Brauchbarkeit der Blutproben durch ungenügende Kühlung vorzubeugen. Ein weiterer Vorteil der Whatman FTA[®] Filtercards besteht in der Tatsache, dass diese sehr klein sind und deshalb sehr gut transportiert werden können.

Die Kühlung der frischen EDTA Vollblutproben wurde durch eine mit der Autobatterie betriebenen Kühlbox bewerkstelligt bis sie in den Kühlregalen von Supermärkten zwischengelagert werden konnten.

Die in dieser Arbeit eingesetzte DNS Extraktionsmethode von auf Whatman FTA[®] Filtercards aufgebrachten Vollblutproben ist nach Hailemariam *et al.* (2017) eine gute Methode, um DNS von Pathogenen aus Vollblutproben für spätere Untersuchungen mittels PCR und RLB zu extrahieren. Jedoch ist die Nachweisempfindlichkeit für Pathogene im RLB bei Verwendung einer DNS Extraktion aus Vollblut mit einer kommerziellen Spin Column Methode höher, wodurch ein genaueres Bild der Infektionslage bei dieser Methode erzielt wird.

5.2.7 Untersuchung der Zecken und Blutproben auf Pathogene

Für die weiteren molekularbiologischen Untersuchung wurden die adulten Zecken aus der Vegetation (n = 310), die gepoolten Zeckenlarven (n = 28) und alle Blutproben (n = 481) verwendet. Die von den Rindern abgesammelten Zecken (n = 2318) wurden nicht weiter untersucht. Gesogene Zecken enthalten das Blut der Wirtstiere, welches möglicherweise bereits infiziert ist. Deshalb kann man nicht ermitteln, ob die untersuchte Zecke bereits vor der Blutmahlzeit an einem infizierten Rind Träger eines Pathogens war oder ob sie den Erreger erst mit der Blutmahlzeit aufgenommen hat. Daher ist die Untersuchung von Zecken vor deren Blutmahlzeit über deren Infektionsstatus aussagekräftiger (Estrada-Pena *et al.* 2013).

Um die wichtigsten durch Zecken übertragbaren Erregergruppen nachweisen zu können, wurden 3 unterschiedliche PCR Reaktionen durchgeführt. In der ersten PCR sollte ein Abschnitt des 18S-rRNS Gen der *Babesia* spp. und *Theileria* spp., in der zweiten das 16S-rRNS Gen der *Rickettsiales* und in der dritten die 5S-23S Genregion der *Borrelia* spp. amplifiziert werden. Zur Überprüfung einer erfolgreichen PCR Reaktion wurden die PCR-Produkte zuerst mit einem Agarosegel und erst darauf mit dem RLB untersucht. Dieses ist ein hochoempfindliches und spezifisches Verfahren, bei dem bis zu 43 Pathogene gleichzeitig nachgewiesen werden können (Kong und Gilbert 2006). Zur Bestätigung der RLB Ergebnisse wurden von einigen ausgewählten im RLB positiven Proben die Zielgene sequenziert, da nach Estrada-Pena *et al.* (2013) auch diagnostische Verfahren durch Kreuzreaktionen und unzureichende Spezifität zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Daher sind Ergebnisse dieser Untersuchungen immer kritisch zu beurteilen.

Bisher wurde in der Mongolei noch kein Screening der Zecken und Rinderpopulation auf so viele unterschiedliche durch Zecken übertragbare Erreger durchgeführt.

5.2.8 Herdenfragebogen

Ein zusätzlicher Teil der Studie bestand aus einem Herdenfragebogen (siehe Anhang 9.3). Die Tierhalter wurden von mongolischen Helfern in ihrer Landessprache befragt, welche dann wiederum die Antworten ins Englische übersetzten. Die Fragen sollten ein Bild der Herdengesundheit und regionalen Gegebenheiten vermitteln. Bei der Herdengesundheit wurde besonders auf die Hauptsymptome der bovinen Babesiose (Inappetenz, Schwäche,

Hämoglobinurie, Mortalität und Aborte) (Bock *et al.* 2004) geachtet. Dabei wurde vor allem auf die Symptome Hämoglobinurie und Mortalität Wert gelegt wurde, welche von Tierhaltern bei einer extensiven Haltung gut zu erkennen sind. Erfragt wurden aber auch weitere Krankheitsanzeichen der Tiere. Außerdem wurde in Erfahrung gebracht, ob und mit welchen Mitteln eine antiparasitäre Behandlung der Rinder erfolgt war. Dies war von Relevanz, um die Intensität des Zeckenbefalls und die Infektionsgefahr der Rinder durch diese einschätzen zu können. Zudem sollten die Tierhalter eine Auskunft über weitere Auffälligkeiten oder Besonderheiten geben, die als mögliche Ursachen später zu erklärender Ergebnisse hätten dienen können.

Die Erfassung der regionalen Gegebenheiten beruhte vor allem auf der Vegetation, wobei hier eine Einteilung in "Steppe" und "Waldsteppe" erfolgte. Dies sollte dazu dienen das Vorkommen der zu erwartenden Zeckenarten beurteilen zu können, welches an die Gegebenheiten der Vegetation gekoppelt ist (Dash 1988; Daš *et al.* 1989).

5.3 Besprechung der Ergebnisse

5.3.1 Zecken

5.3.1.1 Gefundene Zeckenarten

Es wurden 310 adulte Zecken aus der Vegetation geflaggt und von den Jurten abgesammelt. Die relativ geringe Zahl der auf diese Weise erhaltenen Zecken könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zeckensaison während des untersuchten Zeitraumes (Mai bis Juni) ihren Höhepunkt (April) (Dash 1988) bereits überschritten hatte. Es ist anzunehmen, dass ein Großteil der adulten Zecken zum Untersuchungszeitpunkt bereits einen Wirt aufgesucht hatte. Die von den Rindern stichprobenmäßig abgesammelte hohe Anzahl an Zecken (2318) spricht für diese These. Beim Absammeln der Zecken konnte zudem beobachtet werden, dass viele Tiere massiv von diesen befallen waren. Für den Erfolg der Zeckensammlung durch Flaggen der Vegetation spielen zudem witterungsbedingte Faktoren eine große Rolle. So kann an heißen Tagen die Erfolgsquote beim Flaggen deutlich gemindert werden (Dantas-Torres *et al.* 2013). Die Temperaturen und Witterungsbedingungen wurden während des Studienzeitraumes nicht im Einzelnen erfasst. Die Temperaturen variierten jedoch stark zwischen Minustemperaturen und über 30 °C, was die unterschiedliche Erfolgsrate beim Flaggen ebenfalls erklären könnte.

Alle untersuchten Zecken konnten der Art *Dermacentor nuttalli* zugeordnet werden. Es wurden keine bekannten Vektorzecken von *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Theileria orientalis* oder *Anaplasma marginale* (Kapitel 2.2.1 Tab. 2; Kapitel 2.2.2; Kapitel 2.2.3) in dieser Studie nachgewiesen.

Nach Dash (1986) war in den Studienregionen mit dem Auftreten der Zeckenarten *D. nuttalli*, *D. silvarum*, *I. persulcatus* und *I. crenulatus* zu rechnen. Dass allein *D. nuttalli* gefunden wurde, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Dominanz der Zeckenart in der untersuchten Region. Man kann Zecken zudem in nesthockende und nicht nesthockende Zecken einteilen, wobei *I. crenulatus* zu den nesthockenden Zecken zählt, die den Bau oder das Nest zur Nahrungssuche nicht verlassen und daher kaum außerhalb dieser anzutreffen sind (Sonenshine und Roe 2014). Die Wahrscheinlichkeit, diese Zeckenart durch Flaggen zu finden, ist aus diesem Grund daher eher gering. *I. persulcatus* und *D. silvarum* haben möglicherweise auch

andere Habitate, in denen sie eher vorkommen als in den untersuchten, weshalb beide in dieser Studie nicht gefunden wurden.

In den letzten 30 Jahren wurde ein gesteigertes Vorkommen und eine vermehrte Verbreitung von vielen wichtigen Zeckenarten in teilweise nördliche Gebiete beobachtet (Leger *et al.* 2013). Die Einschleppung von Zecken des Genus *Rhipicephalus* in ein Land wäre keine Neuheit gewesen. So wurde *Rhipicephalus microplus* in der Vergangenheit in Westafrika eingeschleppt und breitete sich dort aus (Madder *et al.* 2007; Madder *et al.* 2012). Im Zusammenhang mit Tiertransporten aus Afrika wurden bereits zuvor *Rhipicephalus microplus* und *Rhipicephalus annulatus* nach Nordamerika eingeschleppt und verbreiteten sich in Mexico und den USA, wo sie jedoch erfolgreich getilgt werden konnten (Jongejan und Uilenberg 2004). Die Frage nach den Vektorzecken ist in der Mongolei von großer Bedeutung gewesen. Wären diese nachgewiesen worden, hätte eine schnelle und gezielte Intervention die Ausbreitung der Zecken eventuell verhindern können, wie es in den USA der Fall gewesen war.

Mit *Rhipicephalus pumilio* gibt es in der Mongolei bisher nur eine beschriebene Art der Gattung *Rhipicephalus*. Ursächlich sind hierfür wahrscheinlich die extremen klimatischen Bedingungen. Temperaturen von minus 50 °C sind in den nördlichen Regionen der Mongolei im Winter keine Seltenheit. In den südlichen Regionen der Wüste Gobi sinken die Temperaturen nicht so tief, weshalb *Rhipicephalus pumilio* nach Dash (1986) vor allem dort zu finden ist. Ein Auftreten der eher in tropischen Regionen vorkommenden Arten der Gattung *Rhipicephalus*, die als Vektoren für *B. bovis*, *B. bigemina* und *A. marginale* beschrieben sind (siehe Kapitel 2.2.1 Tab. 2 und Kapitel 2.2.3), wäre in einer Region, in der ein kontinentales Klima herrscht, eher unwahrscheinlich gewesen.

5.3.1.2 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung der adulten Zecken aus der Vegetation

Mit der extrahierten DNS der adulten Zecken aus der Vegetation wurden 3 verschiedene PCR Reaktionen durchgeführt und im Anschluss die erhaltenen PCR-Produkte mit dem RLB untersucht. Zur Bestätigung der Ergebnisse des RLB wurden zuletzt ausgewählte Proben untersucht, indem bestimmte Genabschnitte der im RLB gefundenen Erreger sequenziert wurden. Die erhaltenen Sequenzen wurden für eine molekularbiologische Artbestimmung verwendet.

Die RLB Untersuchungen zeigten bei 252 von 310 Zecken positive Signale (81,3 %) für *Rickettsia raoultii*. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da in einer vorherigen Studie in 97 % der in Khentii gesammelten und untersuchten *D. nuttalli* Zecken *R. raoultii* gefunden wurde (Speck *et al.* 2012).

Zudem konnte ermittelt werden, dass die RLB-Sonde "*Anaplasma/Ehrlichia* catch-all" immer positiv reagierte, wenn die Probe positiv für *R. raoultii* war. Die Gensequenzen der RLB-Sonde und das Gen von *R. raoultii* unterschieden sich nur an einer Position, weshalb eine Kreuzreaktion wahrscheinlich erscheint. Dieses Phänomen ließ sich auch bei den untersuchten juvenilen Zecken beobachten (siehe Kapitel 5.3.1.3).

Babesia caballi (5/310; 1,6 %) und *Theileria equi* (16/310; 5,2 %) wurden ebenfalls im RLB nachgewiesen und das 18S Gen der ribosomalen RNS erfolgreich sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung bestätigten das Vorkommen dieser Erreger. *D. nuttalli* ist bereits als Vektor von *B. caballi* und *T. equi* bekannt (Scoles und Ueti 2015). Beide wurden in der Vergangenheit mehrfach in dem mongolischen Pferdebestand nachgewiesen (Boldbaatar *et al.* 2005; Ruegg *et al.* 2007; Sloboda *et al.* 2011). Auch wurden beide Erreger bereits in adulten *D. nuttalli* Zecken sowie deren Eiern und Larven aus dem Aimag Tuv gefunden (Battsetseg *et al.* 2001; Battsetseg *et al.* 2002).

Es gab zudem für *Midichloria* spp. positive Signale (18/310; 5,8 %) im RLB. *Candidatus* *Midichloria mitochondrii* (hiernach *M. mitochondrii*) gehört in die Klasse der α -Proteobakterien und dort in die Gruppe der Rickettsiales. Es ist das erste Bakterium, welches in Mitochondrien von Tieren nachgewiesen wurde (Beninati *et al.* 2004; Sasser *et al.* 2006). *Midichloria mitochondrii* ist ein Symbiont der Zecken und kommt in 100 % der weiblichen und 44 % der männlichen *I. ricinus* Zecken vor, ist inzwischen aber auch in anderen Zeckenarten der Gattung *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma*, *Hyalomma* und *Dermacentor* gefunden worden (Lo *et al.* 2006; Sasser *et al.* 2006; Dergousoff und Chilton 2011; Bazzocchi *et al.* 2013; Montagna *et al.* 2013). Inzwischen weiß man, dass *M. mitochondrii* auch in den Speicheldrüsen der Zecken präsent sein kann und mit dem Zeckenspeichel auf den Wirt übertragen werden kann (Mariconti *et al.* 2012). Das Auftreten von *M. mitochondrii* wurde in Menschen, Hunden, Pferden und Schafen beschrieben. Auch wurde nachgewiesen, dass durch das Bakterium eine Immunantwort induziert wird (Mariconti *et al.* 2012; Bazzocchi *et al.* 2013).

Es zeigte sich ein positives Signal (0,3 %) für *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis (hiernach *N. mikurensis*) im RLB. *N. mikurensis* ist ein erst vor kurzer Zeit entdecktes α -Proteobakterium aus der Familie der *Anaplasmataceae*, welches das erste Mal in *Ixodes ricinus* Zecken in den Niederlanden nachgewiesen wurde (Schouls *et al.* 1999). Es scheint, dass die Prävalenz in *I. ricinus* Zecken innerhalb Europas bei 6-8 % und in *I. persulcatus* bei ca. 1 % liegt (Silaghi *et al.* 2016). Bei mehreren immunsupprimierten Menschen, aber auch bei einem gesunden Mann wurde *N. mikurensis* als Krankheitsursache diagnostiziert. Bei Haustieren gab es jedoch nur zwei Verdachtsfälle bei Hunden (Diniz *et al.* 2011; Beck *et al.* 2014). In einer inzwischen veröffentlichten Studie konnte *N. mikurensis* in *I. persulcatus* Zecken aus der Mongolei nachgewiesen werden (Karnath *et al.* 2016). Das Ergebnis dieser Studie bestätigt die Präsenz von *N. mikurensis* in dem mongolischen Zeckenbestand und ist wohl nicht nur auf *D. nuttalli* Zecken beschränkt.

Es wurde nur eine Zecke (T128) (0,3 %) aus Bajan-Adarga im RLB positiv auf die zwei Signale "Theileria/Babesia catch-all" und "Babesia catch-all 2" getestet, ohne, dass ein speziesspezifisches Signal angezeigt wurde. Eine anschließende Sequenzierung des 18S Gens der ribosomalen RNS zeigte das Vorhandensein von *T. orientalis*. In der Mongolei wurden bereits 5 Genotypen (1,3,5,7 und N-3) von *T. orientalis* beschrieben, so konnten Altangerel *et al.* (2011) in 30 % der untersuchten Zecken aus den Somonen Tsenkhermandal, Dschargaltchaan, Undurhaan und Dadal die Typen 1, 5 und N-3 nachweisen. Die Detektion der *Theileria* spp. in der Studie beruhte damals auf dem Nachweis des 776-bp DNS Fragments des MSPS Gens mit einer PCR, wogegen in der vorliegenden Studie das 18S Gen der ribosomalen RNS mit dem PCR basierten RLB nachgewiesen wurde. Eine unterschiedliche Sensivität der beiden Methoden könnte eine Erklärung für den Unterschied in der vorhandenen Prävalenz sein. Zudem scheint die in dieser Studie verwendete RLB-Sonde für *T. orientalis* (*T. buffeli*-Sonde) nicht alle *Theileria* spp. zu detektieren, da diese RLB-Sonde die positive Probe nicht anzeigte, sondern nur durch ein "Catch-all" Signal detektiert wurde. Darüber hinaus sind nur Zecken der Gattung *Haemaphysalis* als Vektorzecken für *T. orientalis* bekannt (Watts *et al.* 2016). Dass der untersuchte Rinderbestand nicht von *T. orientalis* durchseucht ist (siehe Kapitel 5.3.2.1), ließe sich demnach auch dadurch erklären, dass keine Zecken der Gattung *Haemaphysalis* auf den Rindern und in der Nähe der Pferche gefunden wurden. Inzwischen wird noch *Rhipicephalus microplus* als möglicher weiterer Vektor für *T. orientalis* vermutet (Kakati *et al.* 2015). Diese Zecke ist ebenfalls ein Hauptvektor von *B. bovis* und *B. bigemina*, weshalb das Auftreten dieser Zeckenart die Präsenz der gesuchten Erreger hätte erklären

können. Jedoch sollte in Zukunft auch das Vektorpotential von *D. nuttalli* für *T. orientalis* weiter abgeklärt werden, da in dieser Studie der Erreger in einer *D. nuttalli* Zecke nachgewiesen wurde.

In den Zecken wurde, wie in den Blutproben (siehe Kapitel 5.3.2.1), eine *A. ovis* ähnliche *Anaplasma* sp. gefunden. Auch wenn die Vermutung nahe liegt, dass *D. nuttalli* ein Vektor der gefundenen Anaplasmenart ist, müsste dies in weiteren Untersuchungen erst noch nachgewiesen werden, da der Nachweis von DNS eines bestimmten Erregers in einer Zeckenart nach Estrada-Pena *et al.* (2013) noch keine Aussage über die Übertragung des Erregers durch diese Zecke auf einen Wirt zulässt. Außerdem kommen für die Übertragung von Anaplasmen neben Zecken weitere Arthropoden in Frage (siehe Kapitel 2.2.3).

Borrelia afzelii wurde ebenfalls in einer *D. nuttalli* Zecke (T054) (0,3 %) aus Delgerchaan nachgewiesen und die 5S-23S Region konnte fast vollständig sequenziert werden. Das Vorkommen von *Bor. afzelii* ist in aus der Mongolei stammenden *I. persulcatus* Zecken bereits beschrieben worden (Masuzawa *et al.* 2014), jedoch noch nicht in Zecken der Art *D. nuttalli*. Da bisher nur die Zeckenarten *I. persulcatus* und *I. ricinus* als Vektoren für *Bor. afzelii* beschrieben sind (Rudenko *et al.* 2011), sollte in Zukunft das Vektorpotential von *D. nuttalli* für diesen Erreger näher untersucht werden.

Die RLB Untersuchungen zeigten noch weitere positive Signale für *Bor. afzelii*. Diese hatten aber kein positives "Catch-all Signal". Durch weiterführende Untersuchungen kam heraus, dass es sich um Kreuzreaktionen mit der gefundenen *Anaplasma* sp. handelte. Kreuzreaktionen können bei RLB Untersuchungen vorkommen. Deshalb sollten auffällige Ergebnisse immer mittels einer Sequenzierung bestätigt werden.

5.3.1.3 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung der juvenilen Zeckenstadien

Rickettsia raoultii wurde in 27 (96,4 %) der gepoolten Proben nachgewiesen. Eine vertikale Übertragung von *Rickettsia* spp. in Zecken ist bereits bekannt und hilft diesen, sich schnell zu verbreiten, wobei aber auch Nager als Reservoir dienen können (Parola *et al.* 2013). Auch für *R. raoultii* wurde bereits eine vertikale Übertragung nachgewiesen (Alberdi *et al.* 2012). Da die

untersuchten juvenilen Zeckenstadien bereits Nagerblut aufgenommen hatten, ist im Nachhinein nicht zu klären, ob die Zeckenlarven bereits durch eine vertikale Übertragung mit *R. raoultii* infiziert waren, wofür der hohe Durchseuchungsgrad der Zeckenpopulation von *D. nuttalli* mit dem Bakterium spricht, oder ob die Zeckenlarven erst später das Bakterium mit dem Nagerblut aufgenommen haben.

Wie auch bei den adulten Zecken (siehe Kapitel 5.3.1.2) war das Vorhandensein von *R. raoultii* mit einem positiven "*Anaplasma/Ehrlichia* catch-all" Signal verbunden, was durch eine Kreuzreaktion zu erklären ist.

Außerdem waren 2 (7,1 %) juvenile Zeckenproben positiv für *Midichloria* spp.. Eine vertikale Übertragung des Erregers kommt bei der Zecke *I. ricinus* vor (Mariconti *et al.* 2012) und wäre demnach auch bei *D. nuttalli* Zecken möglich, was jedoch weiter untersucht werden müsste.

5.3.2 Blutproben

5.3.2.1 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen der Blutproben

Von den 481 Vollblutproben gingen 32 beim Transport verloren. Alle verlorenen Proben waren jedoch vorher bereits auf Whatman FTA[®] Filtercards gesichert worden.

Nachdem ein "Catch-all" Signal für Anaplasmen ohne ein speziesspezifisches Signal angezeigt wurde, konnte eine Sequenzierung der erhaltenen PCR-Produkte der Blutproben B220 und B251 eine dem Bakterium *A. ovis* ähnliche *Anaplasma* sp. nachweisen. Da sich dieses Bakterium nicht durch eine speziesspezifische RLB-Sonde detektieren ließ, wurde empirisch versucht, eine geeignete RLB-Sonde für den speziesspezifischen Nachweis der gefundenen *Anaplasma* sp. zu entwickeln. Das gelang jedoch nur bedingt, da die hypervariable Region, die für den spezifischen Nachweis der *Anaplasma* spp. erforderlich ist, eine große Ähnlichkeit zu anderen Anaplasmenarten aufwies. Hierdurch waren die Möglichkeiten für die Entwicklung von neuen RLB-Sonden stark eingeschränkt. Trotzdem konnten vier unterschiedlichen RLB-Sonden (*A. mongolia*, *A. mongolia* 2, *A. mongolia* 3 und *A. mongolia* 4) designiert und getestet werden. Die empirische Untersuchung ergab, dass eine Sondenkombinationen mit "*A. mongolia* 2", "*A. mongolia* 3" und "*A. mongolia* 4" als positiver Befund zu werten war. Auch wenn nur die RLB-Sonden "*A. mongolia* 2" und "*A. mongolia* 3" anschlagen, konnte das als positiver Befund gewertet werden. Wenn die RLB-Sonde "*A. mongolia* 3" jedoch alleine

positiv reagierte, konnte das Ergebnis nicht durch eine Sequenzierung bestätigt werden. Deshalb wurden Proben, die allein für die RLB-Sonde "*A. mongolia 3*" positiv waren, nicht als positiver Nachweis für die neu entdeckte *Anaplasma* sp. gewertet. Die RLB-Sonde "*A. mongolia*" zeigte im RLB keine positiven Signale und war deshalb unbrauchbar. Die RLB-Sonde "*A. mongolia 2*" ist deswegen als zuverlässigste RLB-Sonde für eine Anzeige der gefundenen Anaplasmenart ermittelt worden.

Dass die gefundene *Anaplasma* sp. bisher noch nicht weiter beschrieben wurde, könnte daran gelegen haben, dass die Pathogenität dieses Bakteriums anscheinend sehr gering ist. Kaum einer der befragten Nomaden hatte Krankheitsanzeichen bei seinen Tieren entdeckt (siehe Kapitel 5.3.4). Zudem scheinen die bisher verwendeten diagnostischen Tests zu unspezifisch gewesen zu sein, um das gefundene Bakterium von anderen zu unterscheiden. Möglicherweise waren die bisherigen Tests auch nicht sensibel genug, um die entdeckte *Anaplasma* sp. nachzuweisen.

In den Rinderblutproben wurde weder *B. bovis* noch *B. bigemina* nachgewiesen. Die beiden Pathogene konnten somit weder in den Zecken noch in den Blutproben nachgewiesen werden. Auch wurden keine ihrer bekannten Vektorzeckenarten in dieser Studie gefunden (siehe Kapitel 5.3.1.1), was ein Vorkommen der Erreger noch unwahrscheinlicher macht.

Da in den zugrundeliegenden Quellen, die das Vorkommen der Erreger in der Mongolei beschreiben (AbouLaila *et al.* 2010; Sivakumar *et al.* 2012), keine weiteren Informationen über die genaue Herkunft der untersuchten Rinderblutproben zu finden sind, wäre es möglich, dass die *Babesia* spp. nur in bestimmten begrenzten Regionen auftreten, welche in dieser Studie jedoch nicht erfasst wurden.

Eine weitere Erklärung für den von AbouLaila *et al.* (2010) und Sivakumar *et al.* (2012) beschriebenen Nachweis der beiden *Babesia* spp. in den mongolischen Rindern wäre die Möglichkeit, dass die beprobten Rinder ursprünglich nicht aus der Mongolei stammten, sondern aus einem anderen Land, in dem die bovine Babesiose endemisch vorkommt. Sie hätten so möglicherweise persistent infiziert sein können.

Dass in keiner untersuchten Rinderblutprobe *T. orientalis* nachgewiesen wurde, wirft ebenfalls Fragen auf. Auch wenn die bekannten Vektorzecken in der Studie nicht gefunden wurden, liegt die Vermutung nahe, dass *D. nuttalli* ein möglicher Vektor ist (siehe Kapitel 5.3.1.2). Es ist daher zu vermuten, dass das Vorkommen der Erreger auf eine bestimmte Region begrenzt ist, die in dieser Studie nicht erfasst wurde.

5.3.3 Phylogenetische Analyse

Bereits Ybanez *et al.* (2013) hatten neben *A. marginale* ein weiteres Bakterium gefunden, welches nach einer phylogenetischen Analyse des GroEL Gens eine nahe verwandschaftliche Beziehung zu *A. ovis* zeigte. Die in dieser Studie gefundene Anaplasmenart unterscheidet sich in der Sequenz des 16S-rRNS Gens von den bisher bekannten *Anaplasma* spp.. Deshalb wurden neben dem 16S-rRNS Gen zusätzlich die Sequenzen der Gene MSP5 und GroEL ermittelt. Die erhaltenen Gensequenzen wurden für eine phylogenetische Analyse im Rahmen einer "multi locus" Analyse der 3 Gene mit der "maximum-likelihood" Methode eingesetzt. Das Ergebnis zeigte eine nahe verwandschaftliche Beziehung zu *A. ovis*.

Bisher gibt es keine anderen Berichte von *A. ovis* Infektionen bei Rindern. In einer experimentellen Infektion eines splenektomierten amerikanischen Bisons mit *A. ovis* konnte Zaugg (1986) keine Empfänglichkeit für den Erreger nachweisen.

Nach Haigh *et al.* (2008) ist *A. ovis* in den mongolischen Rentierbeständen der nordwestlichen Mongolei verbreitet.

5.3.4 Fragebogen

Bei der Befragung der Tierhalter kam es zu einigen übersetzungsbedingten Problemen, die, so gut es ging, geklärt wurden. Bestimmte Symptome, wie Fieber, Anämie, Hämoglobinurie, Ikterus, Unwohlsein, Lethargie und Anorexie bekommt der Tierhalter in der Regel nur mit, wenn er die Tiere gut beobachtet oder nah an sie herankommt. Da die Rinder extensiv gehalten werden und sich die meiste Zeit weit weg von den Nomaden aufhalten, besteht daher die Möglichkeit, dass Krankheitssymptome von den Tierhaltern nicht erkannt wurden. Zudem ist fraglich, was die Tierhalter an Informationen über ihre Tiere preis gegeben haben, wenn man bedenkt, dass sie Fragen über ihre Tiere einem Tierarzt aus einem anderen Land und einer anderen Kultur beantworten sollten. Daher wäre es möglich, dass sie nicht als schlechte Tierhalter dastehen wollten und so vielleicht nicht alle bestehenden Probleme erwähnt haben.

Nur wenige Herden ($n = 7$) waren nach Angaben der Tierhalter mit Antiparasitika behandelt worden. Ein Tierhalter berichtete in seiner Herde (H 60) von 20 Aborten. Aborte bei Rindern können durch eine Infektion mit Babesien verursacht werden (Bock *et al.* 2004), jedoch können eine Vielzahl an Bakterien, Viren, Protozoen und Pilzen ebenfalls zu Aborten bei Rindern führen (Holler 2012). Da keine weiteren Symptome der bovinen Babesiose von den Tierhaltern

beobachtet wurden, ist in diesem Fall nicht davon auszugehen, dass die Ursache der Aborte in einer Infektion mit Babesien lag. Die Aussage eines Tierhalters, der von 2 Rindern berichtete, die "müde" seien, konnte durch weiteres Hinterfragen zusätzlicher klinischer Symptome den Verdacht auf eine mögliche Infektion mit Babesien nicht erhärten. In einer anderen Herde lag ein Rind fest und musste euthanasiert werden. Die restlichen Tierhalter meinten, dass ihre Tiere gesund seien. Eine Vakzinierung gegen Maul- und Klauenseuche, Brucellose und Anthrax wird anscheinend bei vielen Rindern vorgenommen und größtenteils staatlich unterstützt (Odontsetseg *et al.* 2005).

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Es wurde keine bekannte Vektorzeckenart von *B. bovis* und *B. bigemina* in dieser Studie gefunden. Auch konnten beide Erreger in keiner der untersuchten *D. nuttalli* Zecken nachgewiesen werden, welche als mögliche Vektoren hätten dienen können. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die gesuchten *Babesia* spp. in den untersuchten Herden der Somone nicht präsent sind. Die These wird durch die Informationen der Tierhalter unterstützt, welche keine klinischen Symptome einer bovinen Babesiose bei ihren Tieren beobachten konnten. Die Ergebnisse dieser Studie widersprechen den Ergebnissen der vorangegangenen Studien von AbouLaila *et al.* (2010) und Altangerel *et al.* (2012) sowie Sivakumar *et al.* (2012).

T. orientalis konnte in keinem Rind, aber in einer untersuchten *D. nuttalli* Zecke nachgewiesen werden.

Es könnte bei beiden Erregergruppen vermutet werden, dass deren Vorkommen regional stark begrenzt ist. Die Tatsache, dass die Tierherden teilweise sehr weit voneinander entfernt sind, wäre eine mögliche Erklärung, warum sich die Erreger im mongolischen Rinder- und Zeckenbestand nicht ausgebreitet haben. Dagegen sprechen jedoch die durch den Nomadismus bedingten weiten Wanderungen der Tierherden, welche die Erreger und infizierte Zecken auf diesem Wege verbreiten könnten.

Eine bisher nicht beschriebene *Anaplasma* sp., welche dem Bakterium *A. ovis* verwandtschaftlich nahe steht, konnte in großen Teilen des untersuchten Rinderbestands und in adulten Zecken der Art *D. nuttalli* nachgewiesen werden. Dass *D. nuttalli* für die gefundene

Anaplasma sp. ein Vektor ist, scheint zwar wahrscheinlich, sollte aber in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

Das Auftreten von *A. marginale* konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden.

Die Präsenz von *Rickettsia raoultii*, *Babesia caballi* und *Theileria equi* in der Zeckenart *D. nuttalli* in der Mongolei konnte bestätigt werden.

Bor. afzelii konnte ebenfalls in einer *D. nuttalli* Zecke nachgewiesen werden. Bisher konnte der Erreger jedoch nur in Zecken der Art *I. persulcatus* in der Mongolei gefunden werden.

Zudem wurden *Midichloria* sp. und *Neoehrlichia mikurensis* in adulten *D. nuttalli* Zecken nachgewiesen. Die Pathogenität dieser beiden Bakterien ist bisher noch nicht ganz geklärt und ihre Bedeutung für die Gefährdung der Tiergesundheit eher gering einzuschätzen. *Neoehrlichia mikurensis* konnte bereits in Zecken nachgewiesen werden, jedoch in dieser Studie das erste Mal in Zecken der Art *D. nuttalli*.

Die Vektorfunktion von *D. nuttalli* für die gefundene *Anaplasma* sp., *T. orientalis*, *Bor. afzelii* und *Midichloria* sp. sollte in weiterführenden Studien untersucht werden, da ein Vorkommen von Pathogenen in bestimmten Zeckenarten noch nicht bedeutet, dass diese die Erreger auch übertragen können (Estrada-Pena *et al.* 2013).

Weitere Veröffentlichungen über das Auftreten von verschiedenen zeckenassoziierten Pathogenen sind im Verlaufe der vorliegenden Studie erschienen. In Selenge, einem benachbarten Aimag von Khentii, wurden in fast einem Viertel der untersuchten *I. persulcatus* Zecken das Vorkommen von *Borrelia burgdorferi* s.l. mit genetisch unterschiedlichen *Borrelia bavariensis*-ähnlichen Stämmen nachgewiesen (Scholz *et al.* 2013). *A. phagocytophilum* und *A. platys* wurden ebenfalls in Selenge in *I. persulcatus* und *D. nuttalli* Zecken gefunden (Javkhlan *et al.* 2014). In einer weiteren Studie wurden *B. venatorum*, *A. phagocytophilum* und *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in *I. persulcatus* Zecken detektiert, die aus den Aimags Selenge, Arkhangai und Khentii, der Zielregion dieser Studie, stammten (Karnath *et al.* 2016). Die Ergebnisse dieser und anderer kürzlich erschienenen Studien zeigen, dass bisher in der Mongolei nicht beschriebene und teilweise neu entdeckte zeckenassoziierte Bakterien und Hämoparasiten in unterschiedlichen Gegenden der Mongolei zu finden sind.

Um den mongolischen Rinderbestand vor Gefahren, die durch neu auftretende Pathogene entstehen könnten, zu schützen, ist ein kontinuierliches Monitoring auf zeckenassoziierte Krankheitserreger in der Mongolei zu empfehlen.

6 Zusammenfassung

Zecken und von diesen übertragbare Krankheitserreger stellen weltweit ein Problem in der Nutztierhaltung dar.

Vor wenigen Jahren berichteten verschiedene Autoren (AbouLaila *et al.* 2010; Altangerel *et al.* 2011; Sivakumar *et al.* 2012; Ybanez *et al.* 2013) erstmalig über den molekularbiologischen Nachweis von den durch Zecken übertragbaren Erregern (*Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* und *Theileria orientalis*) in Vollblutproben von Rindern aus den Regionen Khentii, Uvs und Uvurkhangai der Mongolei. Im Falle von *T. orientalis* konnte dieser Nachweis auch in Zecken der Art *Dermacentor nuttalli* geführt werden. Dieser Nachweis war insofern überraschend, als dass das Vorkommen der für diese Erreger verantwortlichen Vektoren in der Mongolei bisher nicht geführt wurde.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es daher abzuklären, ob sich die eher in tropischen Regionen vorkommenden Hauptvektoren der Gattung *Rhipicephalus* oder andere Vektorzecken inzwischen auch in die Mongolei ausgebreitet haben, oder ob in der Mongolei heimische Zeckenarten mit den gesuchten Erregern infiziert sind und diese potentiell auf Rinder übertragen können. Es sollten daher Zecken und Rinder auf diese und weitere Erreger untersucht werden.

Von Mai bis Juli 2013 wurde eine epidemiologische Studie in dem Aimag Khentii der Mongolei in den 6 Somonen Tsenkhermandal, Dschargaltchaan, Delgerchaan, Binder, Dadal und Bajan-Adarga durchgeführt. Diese Somone wurden als Untersuchungsort ausgewählt, da hier die gesuchten Erreger bereits nachgewiesen wurden. Es wurden adulte Zecken aus der Vegetation, juvenile Zeckenstadien von Nagern sowie EDTA-Blutproben von Rindern gesammelt. Außerdem wurden Zecken von den beprobten Rindern in die Untersuchung mit einbezogen. Die Zeckenarten wurden mittels eines geeigneten Identifikationsschlüssels und im Falle der juvenilen Zecken molekularbiologisch bestimmt. Die Zecken aus der Vegetation, die juvenilen Zeckenstadien und die Rinderblutproben wurden mit dem PCR basierten Reverse Line Blot Hybridization Assay (RLB) molekularbiologisch auf die Präsenz von Babesien-, Theilerien-, Anaplasmen-, Ehrlichien-, Rickettsien-, Neoehrlichien-, Midichloria- und Borrelien- DNS untersucht. Zur Bestätigung der RLB-Ergebnisse wurden Sequenzierungen bestimmter Zielgene von einigen gefundenen Erregern durchgeführt.

Es konnten insgesamt 2318 (778 m/1540 w) adulte Zecken von Rindern, 310 (169 m/141 w) adulte Zecken aus der Vegetation und 249 Zeckenlarven von 23 Nagern gesammelt werden.

Alle adulten Zecken konnten der Art *Dermacentor nuttalli* zugeordnet werden.

Die RLB Untersuchung der Zecken aus der Vegetation zeigte das Vorkommen von DNS einer bislang uncharakterisierten *Anaplasma* sp. (26/310; 8,4 %), *Theileria orientalis* (1/310; 0,3 %), *Theileria equi* (16/310; 5,2 %), *Babesia caballi* (5/310; 1,6 %), *Rickettsia raoultii* (252/310; 81,3 %), *Borrelia afzelii* (1/310; 0,3 %), *Midichloria* sp. (18/310; 5,8 %) und *Neoerhlichia mikurensis* (1/310; 0,3 %).

In den 28 Pools der Zeckenlarven konnte im RLB die DNS von *Rickettsia raoultii* (27/28; 96,4 %) und *Midichloria* sp. (2/28; 7,1 %) nachgewiesen werden.

Die DNS der uncharakterisierten *Anaplasma* sp. konnte im RLB in 153 (31,8 %) der 481 gesammelten Rinderblutproben detektiert werden. Eine phylogenetische Analyse dieser *Anaplasma* sp. zeigte eine nahe verwandtschaftliche Beziehung zu *Anaplasma ovis*.

Babesia bovis, *Babesia bigemina* und *Anaplasma marginale* konnten mittels RLB weder in den Vollblutproben der Rinder noch in den Zecken nachgewiesen werden.

Die nomadischen Tierhalter hatten bei ihren Rindern keine klinischen Zeichen einer bovinen Babesiose, Theileriose oder Anaplasrose beobachten können, die hinweisgebend für eine akute Erkrankung gewesen wären.

Die Ergebnisse können das Auftreten der beschriebenen Erreger nur im Fall von *Theileria orientalis* bestätigen.

Aufgrund der Vielzahl und Vielfalt der gefundenen Mikroorganismen und der Befunde aus anderen kürzlich erschienen Studien sollten in Zukunft weiterführende Untersuchungen des mongolischen Tierbestandes auf durch Zecken übertragbare Krankheitserreger erfolgen, um eventuell auftretende Risiken für die Gesundheit des mongolischen Tierbestandes schnell erkennen zu können.

7 Summary

„Ticks and tick-borne pathogens of cattle in Khentii District, Mongolia“

Ticks and tick-borne diseases affect the livestock industry worldwide. Recently, several studies were published which described the molecular detection of the tick-borne pathogens *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* and *Theileria orientalis* in bovine blood samples collected from the provinces Khentii, Uvs and Uvurkhangai in Mongolia (AbouLaila *et al.* 2010; Altangerel *et al.* 2011; Sivakumar *et al.* 2012; Ybanez *et al.* 2013). *Theileria orientalis* was also found in *Dermacentor nuttalli* ticks collected from the same regions. These findings were unexpected, as the known tick vectors (mainly *Rhipicephalus* spp.) are not known to exist in Mongolia. The aim of this study was therefore to screen Mongolian ticks and cattle for tick-borne pathogens to investigate if known tick vectors now occur in Mongolia, or if local tick species may act as vectors for these pathogens.

An epidemiological study was conducted in the six Somons of Tsenkhermandal, Dschargaltchaan, Delgerchaan, Binder, Dadal und Bajan-Adarga in the Khentii district of Mongolia during May to July 2013. The selection of these Somons was based on previous publications which reported the causal agents of bovine babesiosis, theileriosis and anaplasmosis to occur in these regions. Ticks and blood samples were collected from 481 heads of cattle. Ticks were also collected from the vegetation and trapped rodents. All blood samples and ticks collected from the vegetation and rodents were screened by PCR followed by a Reverse Line Blot Hybridization Assay (RLB) for the presence of DNA from tick-borne pathogens. The results of selected RLB-positive samples were confirmed by sequencing.

In total 2,318 ticks (778 males/1,540 females) were collected from cattle, 310 adult ticks (169 males/141 females) from the vegetation and 249 tick larvae were collected from 23 rodents. All ticks were identified as *Dermacentor nuttalli*. Known tick vectors of *A. marginale*, *B. bovis* and *B. bigemina* were not found in the study region. DNA from a previously uncharacterized *Anaplasma* sp (26/310; 8,4 %), *Theileria orientalis* (1/310; 0,3 %), *Theileria equi* (16/310; 5,2 %), *Babesia caballi* (5/310; 1,6 %), *Rickettsia raoultii* (252/310; 81,3 %), *Borrelia afzelii* (1/310; 0,3 %) *Midichloria* sp. (18/310; 5,8 %) and *Neoerhlichia mikurensis* (1/310; 0,3 %) was detected by RLB in adult ticks collected from the vegetation. Tick larvae were divided over 28 pools, in which DNA of *Rickettsia raoultii* (27/28; 96,4 %) and *Midichloria* (2/28; 7,1 %) was detected. The uncharacterized *Anaplasma* sp. was also

detected in 153 (31,8 %) of 481 collected bovine blood samples by RLB. A phylogenetical analysis of this *Anaplasma* sp. showed a close relationship to *Anaplasma ovis*.

Babesia bovis, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* could not be detected in the blood samples of cattle or ticks from Khentii district by RLB. None of the farmers reported the occurrence of diseases with clinical signs of bovine babesiosis, theileriosis or anaplasmosis.

The variety of the found microorganisms and the results of recently published studies concerning tick-borne diseases in Mongolia emphasize the need for further monitoring of the Mongolian livestock and tick population for tick-borne pathogens to identify emerging diseases that may threaten the health of Mongolian livestock.

8 Literaturverzeichnis

- Abdelwhab, E. M., Luschow, D., Harder, T. C. und Hafez, H. M. (2011) The use of FTA(R) filter papers for diagnosis of avian influenza virus. *J Virol Methods*, 174(1-2), 120-122.
- AbouLaila, M., Yokoyama, N. und Igarashi, I. (2010) Development and evaluation of two nested PCR assays for the detection of *Babesia bovis* from cattle blood. *Vet Parasitol*, 172(1-2), 65-70.
- Ahmed, H. A., MacLeod, E. T., Hide, G., Welburn, S. C. und Picozzi, K. (2011) The best practice for preparation of samples from FTA (R) cards for diagnosis of blood borne infections using African trypanosomes as a model system. *Parasites & Vectors*, 4.
- Alberdi, M. P., Nijhof, A. M., Jongejan, F. und Bell-Sakyi, L. (2012) Tick cell culture isolation and growth of *Rickettsia raoultii* from Dutch *Dermacentor reticulatus* ticks. *Ticks Tick Borne Dis*, 3(5-6), 349-354.
- Allsopp, B. A. (2010) Natural history of *Ehrlichia ruminantium*. *Vet Parasitol*, 167(2-4), 123-135.
- Allsopp, B. A. (2015) Heartwater--*Ehrlichia ruminantium* infection. *Rev Sci Tech*, 34(2), 557-568.
- Altangerel, K., Battsetseg, B., Battur, B., Sivakumar, T., Batmagnai, E., Javkhlan, G., Tuvshintulga, B., Igarashi, I., Matsumoto, K., Inokuma, H. und Yokoyama, N. (2011) The first survey of *Theileria orientalis* infection in Mongolian cattle. *Vet Parasitol*, 182(2-4), 343-348.
- Altangerel, K., Sivakumar, T., Battsetseg, B., Battur, B., Ueno, A., Igarashi, I. und Yokoyama, N. (2012) Phylogenetic relationships of Mongolian *Babesia bovis* isolates based on the merozoite surface antigen (MSA)-1, MSA-2b, and MSA-2c genes. *Vet Parasitol*, 184(2-4), 309-316.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
- Angelakis, E., Pulcini, C., Waton, J., Imbert, P., Socolovschi, C., Edouard, S., Dellamonica, P. und Raoult, D. (2010) Scalp eschar and neck lymphadenopathy caused by *Bartonella henselae* after Tick Bite. *Clin Infect Dis*, 50(4), 549-551.
- Anonym(a) (2017), <https://www.weltkarte.com/asien/mongolei/karte-provinzen-mongolei.htm>, zuletzt aufgerufen am 07.02.2017.
- Anonym(b) (2012) MONGOLIAN STATISTICAL YEARBOOK 2011. Ulaanbaatar: National Statistical Office of Mongolia.
- Anonym(c) (2017), https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mongolia_Khentii_sum_map-mn-de.png#/media/File:Mongolia_Khentii_sum_map-mn-de.png, zuletzt aufgerufen am 07.02.2017.

- Apanaskevich, D. A. und Horak, I. G. (2010) The genus *Hyalomma*. XI. Redescription of all parasitic stages of *H. (Euhyalomma) asiaticum* (Acari: Ixodidae) and notes on its biology. *Exp Appl Acarol*, 52(2), 207-220.
- Arthur, D. R. (1960) On the genera *Dermacentor*, *Anocentor*, *Cosmiomma* *Boophilus* & *Margaropus*. Ticks. Cambridge: Cambridge University Press.
- Arthur, D. R. (1962) Ticks and disease. Oxford u.a.: Pergamon Press.
- Assadian, O. und Stanek, G. (2002) Theobald Smith-the discoverer of ticks as vectors of disease. *Wien Klin Wochenschr*, 114(13-14), 479-481.
- Aubry, P. und Geale, D. W. (2011) A review of bovine anaplasmosis. *Transbound Emerg Dis*, 58(1), 1-30.
- Auswärtiges Amt (2017), Mongolei, <http://www.auswaertiges-amt.de/DE/Aussenpolitik/Laender/Laenderinfos/01-Laender/Mongolei.html?nnm=383178>, zuletzt aufgerufen am 27.02.2017.
- Babes, V. (1888) Sur l' hémoglobinurie bactérienne du boeuf. *C. R. Acad. Sci.*, 107, 629-694.
- Baneth, G. (2014) Tick-borne infections of animals and humans: a common ground. *Int J Parasitol*, 44(9), 591-596.
- Baneth, G., Samish, M. und Shkap, V. (2007) Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *J Parasitol*, 93(2), 283-299.
- Batsukh, Z., Tsolmon, B., Otgonbaatar, D., Undraa, B., Dolgorkhand, A. und Ariuntuya, O. (2013) One Health in Mongolia. *Curr Top Microbiol Immunol*, 366, 123-137.
- Battsetseg, B., Lucero, S., Xuan, X., Claveria, F., Byambaa, B., Battur, B., Boldbaatar, D., Batsukh, Z., Khaliunaa, T., Battsetseg, G., Igarashi, I., Nagasawa, H. und Fujisaki, K. (2002) Detection of equine *Babesia* spp. gene fragments in *Dermacentor nuttalli* Olenov 1929 infesting mongolian horses, and their amplification in egg and larval progenies. *J Vet Med Sci*, 64(8), 727-730.
- Battsetseg, B., Xuan, X., Ikadai, H., Bautista, J. L., Byambaa, B., Boldbaatar, D., Battur, B., Battsetseg, G., Batsukh, Z., Igarashi, I., Nagasawa, H., Mikami, T. und Fujisaki, K. (2001) Detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in *Dermacentor nuttalli* adult ticks. *Int J Parasitol*, 31(4), 384-386.
- Battsetseg, G. (2013) Persönliche Mitteilung. Mongolian State University of Agriculture, 01.05.2013
- Bazzocchi, C., Mariconti, M., Sassera, D., Rinaldi, L., Martin, E., Cringoli, G., Urbanelli, S., Genchi, C., Bandi, C. und Epis, S. (2013) Molecular and serological evidence for the circulation of the tick symbiont *Midichloria* (*Rickettsiales: Midichloriaceae*) in different mammalian species. *Parasit Vectors*, 6, 350.

- Beck, A., Huber, D., Anatolić, M., Anzulović, Ž., Reil, I. und Beck, R. (2014) Molecular retrospective study of canine infectious haemolytic anaemias, in Cutting Edge Pathology, 2nd Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVF, Berlin, 84-84.
- Bekker, C. P., de Vos, S., Taoufik, A., Sparagano, O. A. und Jongejan, F. (2002) Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. *Vet Microbiol*, 89(2-3), 223-238.
- Beninati, T., Lo, N., Sacchi, L., Genchi, C., Noda, H. und Bandi, C. (2004) A novel alpha-Proteobacterium resides in the mitochondria of ovarian cells of the tick *Ixodes ricinus*. *Appl Environ Microbiol*, 70(5), 2596-2602.
- Bezuidenhout, J. D. (1987) Natural transmission of heartwater. *Onderstepoort J Vet Res*, 54(3), 349-351.
- Bhoora, R., Franssen, L., Oosthuizen, M. C., Guthrie, A. J., Zweygarth, E., Penzhorn, B. L., Jongejan, F. und Collins, N. E. (2009) Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. *Vet Parasitol*, 159(2), 112-120.
- Bilgic, H. B., Karagenc, T., Simuunza, M., Shiels, B., Tait, A., Eren, H. und Weir, W. (2013) Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Theileria annulata*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle. *Exp Parasitol*, 133(2), 222-229.
- Bishop, R., Musoke, A., Morzaria, S., Gardner, M. und Nene, V. (2004) *Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks. *Parasitology*, 129 Suppl, 271-283.
- Bock, R., Jackson, L., de Vos, A. und Jorgensen, W. (2004) Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129 Suppl, 247-269.
- Bock, R. E., Kingston, T. G. und de Vos, A. J. (1999) Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *B. bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. *Aust Vet J*, 77(7), 461-464.
- Boldbaatar, D., Xuan, X., Battsetseg, B., Igarashi, I., Battur, B., Batsukh, Z., Bayambaa, B. und Fujisaki, K. (2005) Epidemiological study of equine piroplasmiasis in Mongolia. *Vet Parasitol*, 127(1), 29-32.
- Brisson, D., Drecktrah, D., Eggers, C. H. und Samuels, D. S. (2012) Genetics of *Borrelia burgdorferi*. *Annu Rev Genet*, 46, 515-536.
- Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (2016), Mongolei Informationen zum Land, https://www.bmz.de/de/laender_regionen/asien/mongolei/profil.html, zuletzt aufgerufen am 19.04.2016.

- Burgdorfer, W., Barbour, A. G., Hayes, S. F., Benach, J. L., Grunwaldt, E. und Davis, J. P. (1982) Lyme-Disease - a Tick-Borne Spirochetosis. *Science*, 216(4552), 1317-1319.
- Burgess, E. C., Gendron-Fitzpatrick, A. und Wright, W. O. (1987) Arthritis and systemic disease caused by *Borrelia burgdorferi* infection in a cow. *J Am Vet Med Assoc*, 191(11), 1468-1470.
- Butler, C. M., Nijhof, A. M., van der Kolk, J. H., de Haset, O. B., Taoufik, A., Jongejan, F. und Houwers, D. J. (2008) Repeated high dose imidocarb dipropionate treatment did not eliminate *Babesia caballi* from naturally infected horses as determined by PCR-reverse line blot hybridization. *Vet Parasitol*, 151(2-4), 320-322.
- Camicas, J.-L. (1998) Les tiques du monde: (*Acarida, Ixodida*) : nomenclature, stades décrits, hôtes, répartition. Paris: éd. de l'Orstrom.
- Chomel, B. (2015) Lyme disease. *Rev Sci Tech*, 34(2), 569-576.
- Christova, I., Van De Pol, J., Yazar, S., Velo, E. und Schouls, L. (2003) Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species, and spotted fever group *Rickettsiae* in ticks from Southeastern Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 22(9), 535-542.
- Cook, M. J. (2015) Lyme borreliosis: a review of data on transmission time after tick attachment. *Int J Gen Med*, 8, 1-8.
- Dantas-Torres, F., Lia, R. P., Capelli, G. und Otranto, D. (2013) Efficiency of flagging and dragging for tick collection. *Exp Appl Acarol*, 61(1), 119-127.
- Daš, M., Bjamba, B. und Splisteser, H. (1989) Die Schildzeckenfauna in der Mongolischen Volksrepublik. *Monatshefte Fur Veterinarmedizin*, 44(13), 471-474.
- Dash, M. (1986) Schildzecken und Maßnahmen zu ihrer Bekämpfung in der MVR [Dissertation]. Humboldt Universität Berlin und Ulan-Bator.
- Dash, M. (1988) Schildzecken und ihre Bekämpfung in der Mongolischen Volksrepublik. *Monatshefte Fur Veterinarmedizin*, 43(5), 166-168.
- de la Fuente, J. (2003) The fossil record and the origin of ticks (*Acari: Parasitiformes: Ixodida*). *Exp Appl Acarol*, 29(3-4), 331-344.
- de Vos, A. J. und Potgieter, F. T. (1994) 'Bovine babesiosis' in Coetzer, J. A. W., Thomson, G. R. und Tustin, R. C., eds., *Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa*, Oxford: Oxford University Press, 278-291.
- Dergousoff, S. J. und Chilton, N. B. (2011) Novel genotypes of *Anaplasma bovis*, "*Candidatus* Midichloria" sp. and *Ignatzschineria* sp. in the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*. *Vet Microbiol*, 150(1-2), 100-106.

- Diniz, P. P., Schulz, B. S., Hartmann, K. und Breitschwerdt, E. B. (2011) "*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*" infection in a dog from Germany. *J Clin Microbiol*, 49(5), 2059-2062.
- Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rikihisa, Y. und Rurangirwa, F. R. (2001) Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(Pt 6), 2145-2165.
- Edgar, R. C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32(5), 1792-1797.
- Estrada-Pena, A. und Estrada-Pena, R. (1991) Notes on *Dermacentor* ticks: redescription of *D. marginatus* with the synonymies of *D. niveus* and *D. daghestanicus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*, 28(1), 2-15.
- Estrada-Pena, A., Gray, J. S., Kahl, O., Lane, R. S. und Nijhof, A. M. (2013) Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens-methodological principles and caveats. *Front Cell Infect Microbiol*, 3, 29.
- Fosgate, G. T. (2009) Practical sample size calculations for surveillance and diagnostic investigations. *J Vet Diagn Invest*, 21(1), 3-14.
- Fourie, J. J., Stanneck, D., Luus, H. G., Beugnet, F., Wijnveld, M. und Jongejan, F. (2013) Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. *Vet Parasitol*, 197(3-4), 595-603.
- Fukunaga, M., Takahashi, Y., Tsuruta, Y., Matsushita, O., Ralph, D., McClelland, M. und Nakao, M. (1995) Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. *Int J Syst Bacteriol*, 45(4), 804-810.
- Garcia-Sanmartin, J., Nagore, D., Garcia-Perez, A. L., Juste, R. A. und Hurtado, A. (2006) Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macroarrays. *BMC Vet Res*, 2, 1-16.
- Giangaspero, A., Marangi, M., Papini, R., Paoletti, B., Wijnveld, M. und Jongejan, F. (2015) *Theileria* sp. OT3 and other tick-borne pathogens in sheep and ticks in Italy: molecular characterization and phylogeny. *Ticks Tick Borne Dis*, 6(1), 75-83.
- Ginsberg, H. S. und Ewing, C. P. (1989) Comparison of flagging, walking, trapping, and collecting from hosts as sampling methods for northern deer ticks, *Ixodes dammini*, and lone-star ticks, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol*, 7(4), 313-322.
- Groves, M. G., Dennis, G. L., Amyx, H. L. und Huxsoll, D. L. (1975) Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am J Vet Res*, 36(7), 937-940.

- Gubbels, J. M., de Vos, A. P., van der Weide, M., Viseras, J., Schouls, L. M., de Vries, E. und Jongejan, F. (1999) Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol*, 37(6), 1782-1789.
- Guglielmone, A. A., Robbins, R. G., Apanaskevich, D. A., Petney, T. N., Estrada-Pena, A., Horak, I. G., Shao, R. F. und Barker, S. C. (2010) The *Argasidae*, *Ixodidae* and *Nuttalliellidae* (*Acari: Ixodida*) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, (2528), 1-28.
- Haigh, J. C., Gerwing, V., Erdenebaatar, J. und Hill, J. E. (2008) A novel clinical syndrome and detection of *Anaplasma ovis* in Mongolian reindeer (*Rangifer tarandus*). *J Wildl Dis*, 44(3), 569-577.
- Hailemariam, Z., Ahmed, J. S., Clausen, P. H. und Nijhof, A. M. (2017) A comparison of DNA extraction protocols from blood spotted on FTA cards for the detection of tick-borne pathogens by Reverse Line Blot hybridization. *Ticks Tick Borne Dis*, 8(1), 185-189.
- Harrus, S. und Waner, T. (2011) Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet J*, 187(3), 292-296.
- Holler, L. D. (2012) Ruminant abortion diagnostics. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 28(3), 407-418.
- Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., 3rd, Krause, P. J. und Persing, D. H. (2000) Babesiosis. *Clin Microbiol Rev*, 13(3), 451-469.
- Hunfeld, K. P., Hildebrandt, A. und Gray, J. S. (2008) Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *International Journal for Parasitology*, 38(11), 1219-1237.
- Javkhlan, G., Enkhtaivan, B., Baigal, B., Myagmarsuren, P., Battur, B. und Battsetseg, B. (2014) Natural *Anaplasma phagocytophilum* infection in ticks from a forest area of Selenge province, Mongolia. *Western Pac Surveill Response J*, 5(1), 21-24.
- Johnson, E. M., Ewing, S. A., Barker, R. W., Fox, J. C., Crow, D. W. und Kocan, K. M. (1998) Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (*Rickettsiales: Ehrlichieae*) by *Dermacentor variabilis* (*Acari: Ixodidae*). *Vet Parasitol*, 74(2-4), 277-288.
- Jongejan, F. und Uilenberg, G. (2004) The global importance of ticks. *Parasitology*, 129 Suppl, 3-14.
- Kakati, P., Sarmah, P. C., Ray, D., Bhattacharjee, K., Sharma, R. K., Barkalita, L. M., Sarma, D. K., Baishya, B. C., Borah, P. und Stanley, B. (2015) Emergence of oriental theileriosis in cattle and its transmission through *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Assam, India. *Vet World*, 8(9), 1099-1104.
- Karnath, C., Obiegala, A., Speck, S., Essbauer, S., Derschum, H., Scholz, H., Kiefer, D., Tserennorov, D., Dashdavaa, O., Tsogbadrakh, N., Jigjav, B. und Pfeffer, M. (2016) Detection of *Babesia venatorum*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Candidatus*

- Neohrlichia mikurensis* in *Ixodes persulcatus* ticks from Mongolia. *Ticks Tick Borne Dis*, 7(2), 357-360.
- Katoh, K. und Standley, D. M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*, 30(4), 772-780.
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F. und Garcia-Garcia, J. C. (2004) *Anaplasma marginale* (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*, 129 Suppl, 285-300.
- Kocan, K. M., de la Fuente, J. und Cabezas-Cruz, A. (2015) The genus *Anaplasma*: new challenges after reclassification. *Rev Sci Tech*, 34(2), 577-586.
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Guglielmono, A. A. und Melendez, R. D. (2003) Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin Microbiol Rev*, 16(4), 698-712.
- Kong, F. und Gilbert, G. L. (2006) Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB)-a practical epidemiological and diagnostic tool. *Nat Protoc*, 1(6), 2668-2680.
- Krupka, I. und Straubinger, R. K. (2010) Lyme borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infections with *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 40(6), 1103-1119.
- Kück, P. und Longo, G. C. (2014) FASconCAT-G: extensive functions for multiple sequence alignment preparations concerning phylogenetic studies. *Front Zool*, 11(1), 81.
- Kulakova, N. V., Khasnatinov, M. A., Sidorova, E. A., Adel'shin, R. V. und Belikov, S. I. (2014) Molecular identification and phylogeny of *Dermacentor nuttalli* (*Acari: Ixodidae*). *Parasitology Research*, 113(5), 1787-1793.
- Leger, E., Voure'h, G., Vial, L., Chevillon, C. und McCoy, K. D. (2013) Changing distributions of ticks: causes and consequences. *Experimental and Applied Acarology*, 59(1-2), 219-244.
- Little, S. E. (2010) Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 40(6), 1121-1140.
- Lo, N., Beninati, T., Sassera, D., Bouman, E. A., Santagati, S., Gern, L., Sambri, V., Masuzawa, T., Gray, J. S., Jaenson, T. G., Bouattour, A., Kenny, M. J., Guner, E. S., Kharitonov, I. G., Bitam, I. und Bandi, C. (2006) Widespread distribution and high prevalence of an alpha-proteobacterial symbiont in the tick *Ixodes ricinus*. *Environ Microbiol*, 8(7), 1280-1287.
- Logan, T. M., Wilson, M. L. und Cornet, J. P. (1993) Association of ticks (*Acari: Ixodoidea*) with rodent burrows in northern Senegal. *J Med Entomol*, 30(4), 799-801.
- Madder, M., Adehan, S., De Deken, R., Adehan, R. und Lokossou, R. (2012) New foci of *Rhipicephalus microplus* in West Africa. *Exp Appl Acarol*, 56(4), 385-390.

- Madder, M., Thys, E., Geysen, D., Baudoux, C. und Horak, I. (2007) *Boophilus microplus* ticks found in West Africa. *Exp Appl Acarol*, 43(3), 233-234.
- Mahan, S. M., Peter, T. F., Simbi, B. H., Kocan, K., Camus, E., Barbet, A. F. und Burridge, M. J. (2000) Comparison of efficacy of American and African *Amblyomma* ticks as vectors of heartwater (*Cowdria ruminantium*) infection by molecular analyses and transmission trials. *J Parasitol*, 86(1), 44-49.
- Man, S. Q., Qiao, K., Cui, J., Feng, M., Fu, Y. F. und Cheng, X. J. (2016) A case of human infection with a novel *Babesia* species in China. *Infect Dis Poverty*, 5, 28.
- Mans, B. J., Pienaar, R. und Latif, A. A. (2015) A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. *Int J Parasitol Parasites Wildl*, 4(1), 104-118.
- Margos, G., Wilske, B., Sing, A., Hizo-Teufel, C., Cao, W. C., Chu, C., Scholz, H., Straubinger, R. K. und Fingerle, V. (2013) *Borrelia bavariensis* sp. nov. is widely distributed in Europe and Asia. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63(Pt 11), 4284-4288.
- Mariconti, M., Epis, S., Gaibani, P., Dalla Valle, C., Sasser, D., Tomao, P., Fabbi, M., Castelli, F., Marone, P., Sambri, V., Bazzocchi, C. und Bandi, C. (2012) Humans parasitized by the hard tick *Ixodes ricinus* are seropositive to *Midichloria mitochondrii*: is *Midichloria* a novel pathogen, or just a marker of tick bite? *Pathogens and Global Health*, 106(7), 391-396.
- Masuzawa, T., Masuda, S., Fukui, T., Okamoto, Y., Bataa, J., Oikawa, Y., Ishiguro, F. und Takada, N. (2014) PCR detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes persulcatus* ticks in Mongolia. *Jpn J Infect Dis*, 67(1), 47-49.
- Matjila, P. T., Leisewitz, A. L., Jongejan, F., Bertschinger, H. J. und Penzhorn, B. L. (2008) Molecular detection of *Babesia rossi* and *Hepatozoon* sp. in African wild dogs (*Lycaon pictus*) in South Africa. *Vet Parasitol*, 157(1-2), 123-127.
- Matjila, T. P., Nijhof, A. M., Taoufik, A., Houwers, D., Teske, E., Penzhorn, B. L., de Lange, T. und Jongejan, F. (2005) Autochthonous canine babesiosis in The Netherlands. *Vet Parasitol*, 131(1-2), 23-29.
- Mays, S. E., Houston, A. E. und Trout Fryxell, R. T. (2016) Comparison of novel and conventional methods of trapping ixodid ticks in the southeastern U.S.A. *Med Vet Entomol*, 30(2), 123-134.
- Mediannikov, O., Matsumoto, K., Samoylenko, I., Drancourt, M., Roux, V., Rydkina, E., Davoust, B., Tarasevich, I., Brouqui, P. und Fournier, P. E. (2008) *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58(Pt 7), 1635-1639.
- Mehlhorn, H. und Schein, E. (1984) The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Adv Parasitol*, 23, 37-103.

- Miller, M. A., Pfeiffer, W. und Schwartz, T. (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees, in SC10 Workshop on Gateway Computing Environments (GCE10), 1-7.
- Montagna, M., Sasser, D., Epis, S., Bazzocchi, C., Vannini, C., Lo, N., Sacchi, L., Fukatsu, T., Petroni, G. und Bandi, C. (2013) "*Candidatus* Midichloriaceae" fam. nov. (*Rickettsiales*), an ecologically widespread clade of intracellular alphaproteobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 79(10), 3241-3248.
- Mosqueda, J., Olvera-Ramirez, A., Aguilar-Tipacamu, G. und Canto, G. J. (2012) Current advances in detection and treatment of babesiosis. *Curr Med Chem*, 19(10), 1504-1518.
- Mtambo, J., Van Bortel, W., Madder, M., Roelants, P. und Backeljau, T. (2006) Comparison of preservation methods of *Rhipicephalus appendiculatus* (*Acari: Ixodidae*) for reliable DNA amplification by PCR. *Exp Appl Acarol*, 38(2-3), 189-199.
- Murray, R. D., Downham, D. Y., Demirkan, I. und Carter, S. D. (2002) Some relationships between spirochaete infections and digital dermatitis in four UK dairy herds. *Research in Veterinary Science*, 73(3), 223-230.
- Murrell, A. und Barker, S. C. (2003) Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (*Acari: Ixodidae*). *Syst Parasitol*, 56(3), 169-172.
- Nijhof, A. M., Bodaan, C., Postigo, M., Nieuwenhuijs, H., Opsteegh, M., Franssen, L., Jebbink, F. und Jongejan, F. (2007) Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 7(4), 585-595.
- Odontsetseg, N., Mweene, A. S. und Kida, H. (2005) Viral and bacterial diseases in livestock in Mongolia. *Jpn J Vet Res*, 52(4), 151-162.
- Oliveira, M. C., Oliveira-Sequeira, T. C., Regitano, L. C., Alencar, M. M., Neo, T. A., Silva, A. M. und Oliveira, H. N. (2008) Detection of *Babesia bigemina* in cattle of different genetic groups and in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick. *Vet Parasitol*, 155(3-4), 281-286.
- Palmer, G. H., Knowles, D. P., Jr., Rodriguez, J. L., Gnad, D. P., Hollis, L. C., Marston, T. und Brayton, K. A. (2004) Stochastic transmission of multiple genotypically distinct *Anaplasma marginale* strains in a herd with high prevalence of Anaplasma infection. *J Clin Microbiol*, 42(11), 5381-5384.
- Parola, P., Paddock, C. D. und Raoult, D. (2005) Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev*, 18(4), 719-756.
- Parola, P., Paddock, C. D., Socolovschi, C., Labruna, M. B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M. Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P. E. und Raoult, D. (2013) Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev*, 26(4), 657-702.
- Parola, P. und Raoult, D. (2001) Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis*, 32(6), 897-928.

- Peter, T. F., Burridge, M. J. und Mahan, S. M. (2002) *Ehrlichia ruminantium* infection (heartwater) in wild animals. *Trends Parasitol*, 18(5), 214-218.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L. und Oliver, J. H., Jr. (2011) Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis*, 2(3), 123-128.
- Ruegg, S. R., Torgerson, P., Deplazes, P. und Mathis, A. (2007) Age-dependent dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in southwest Mongolia based on IFAT and/or PCR prevalence data from domestic horses and ticks. *Parasitology*, 134(Pt 7), 939-947.
- Rymaszewska, A. und Grenda, S. (2008) Bacteria of the genus *Anaplasma* - characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. *Veterinarni Medicina*, 53(11), 573-584.
- Rynkiewicz, E. C. und Clay, K. (2014) Tick community composition in Midwestern US habitats in relation to sampling method and environmental conditions. *Exp Appl Acarol*, 64(1), 109-119.
- Sarani, M., Telmadarraiy, Z., Moghaddam, A. S., Azam, K. und Sedaghat, M. M. (2014) Distribution of ticks (*Acari: Ixodidae*) infesting domestic ruminants in mountainous areas of Golestan province, Iran. *Asian Pac J Trop Biomed*, 4(Suppl 1), 246-251.
- Sassera, D., Beninati, T., Bandi, C., Bouman, E. A., Sacchi, L., Fabbi, M. und Lo, N. (2006) 'Candidatus Midichloria mitochondrii', an endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56(Pt 11), 2535-2540.
- Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M. und Morrison, D. A. (2012) *Babesia*: a world emerging. *Infect Genet Evol*, 12(8), 1788-1809.
- Scholz, H. C., Margos, G., Derschum, H., Speck, S., Tserennorov, D., Erdenebat, N., Undraa, B., Enkhtuja, M., Battsetseg, J., Otgonchimeg, C., Otgonsuren, G., Nymadulam, B., Romer, A., Thomas, A., Essbauer, S., Wolfel, R., Kiefer, D., Zoller, L., Otgonbaatar, D. und Fingerle, V. (2013) High prevalence of genetically diverse *Borrelia bavariensis*-like strains in *Ixodes persulcatus* from Selenge Aimag, Mongolia. *Ticks Tick Borne Dis*, 4(1-2), 89-92.
- Schouls, L. M., Van De Pol, I., Rijpkema, S. G. und Schot, C. S. (1999) Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol*, 37(7), 2215-2222.
- Scoles, G. A. und Ueti, M. W. (2015) Vector ecology of equine piroplasmiasis. *Annual Review of Entomology*, 60, 561-580.
- Silaghi, C., Beck, R., Oteo, J. A., Pfeffer, M. und Sprong, H. (2016) Neoehrlichiosis: an emerging tick-borne zoonosis caused by *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. *Exp Appl Acarol*, 68(3), 279-297.

- Sivakumar, T., Altangerel, K., Battsetseg, B., Battur, B., Aboulaila, M., Munkhjargal, T., Yoshinari, T., Yokoyama, N. und Igarashi, I. (2012) Genetic detection of *Babesia bigemina* from Mongolian cattle using apical membrane antigen-1 gene-based PCR assay. *Vet Parasitol*, 187(1-2), 17-22.
- Sivakumar, T., Hayashida, K., Sugimoto, C. und Yokoyama, N. (2014) Evolution and genetic diversity of *Theileria*. *Infect Genet Evol*, 27, 250-263.
- Skrabalo, Z. und Deanovic, Z. (1957) Piroplasmosis in man; report of a case. *Doc Med Geogr Trop*, 9(1), 11-16.
- Sloboda, M., Jirku, M., Lukesova, D., Qablan, M., Batsukh, Z., Fiala, I., Horin, P., Modry, D. und Lukes, J. (2011) A survey for piroplasmids in horses and Bactrian camels in North-Eastern Mongolia. *Vet Parasitol*, 179(1-3), 246-249.
- Smith, T. und Kilborne, F. L. (1893) Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever, made under the direction of Dr. D.E. Salmon. Washington,: Govt. Print. Off.
- Socolovschi, C., Mediannikov, O., Raoult, D. und Parola, P. (2009) The relationship between spotted fever group *Rickettsiae* and Ixodid ticks. *Veterinary Research*, 40(2).
- Sondermann, L. (1993) Untersuchungen zur Laborzucht von Schildzecken unter besonderer Berücksichtigung von *Dermacentor nuttalli* Olenev, 1928 [Dissertation]. FU Berlin.
- Sonenshine, D. E. und Roe, R. M. (2014) *Biology of ticks*, Vol. I. 2. Auflage., Oxford: Oxford University Press.
- Speck, S., Derschum, H., Damdindorj, T., Dashdavaa, O., Jiang, J., Kaysser, P., Jigjav, B., Nyamdorj, E., Baatar, U., Munkhbat, E., Chojijilsuren, O., Gerelchuluun, O., Romer, A., Richards, A. L., Kiefer, D., Scholz, H., Wolfel, R., Zoller, L., Dobler, G. und Essbauer, S. (2012) *Rickettsia raoultii*, the predominant *Rickettsia* found in Mongolian *Dermacentor nuttalli*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 3(4), 227-231.
- Splisteser, H. (2009) 25 Jahre als Tierarzt in der Mongolei. 1. Auflage., Kückenshagen: Scheunen-Verlag.
- Stamatakis, A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Stanek, G., Wormser, G. P., Gray, J. und Strle, F. (2012) Lyme borreliosis. *Lancet*, 379(9814), 461-473.
- Starcovici, C. (1893) Bemerkungen über den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachte Krankheiten, die seuchenhafte Hämoglobinurie des Rindes (Babes), das Texasfieber (Th.Smith) und der Carceag der Schafe (Babes). *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, 14, 1-8.

- Steere, A. C., Malawista, S. E., Snyderman, D. R., Shope, R. E., Andiman, W. A., Ross, M. R. und Steele, F. M. (1977) Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum*, 20(1), 7-17.
- Stefancikova, A., Stepanova, G., Derdakova, M., Pet'ko, B., Kysel'ova, J., Ciganek, J., Strojny, L., Cislakova, L. und Travnicek, M. (2002) Serological evidence for *Borrelia burgdorferi* infection associated with clinical signs in dairy cattle in Slovakia. *Vet Res Commun*, 26(8), 601-611.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. und Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30(12), 2725-2729.
- Tuomi, J., Rantamaki, L. K. und Tanskanen, R. (1998) Experimental infection of cattle with several *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains; immunological heterogeneity of strains as revealed in serological tests. *Vet Microbiol*, 60(1), 27-43.
- Tyron, U. (1983) Untersuchungen zur medikamentellen Bekämpfung von *Dermacentor nuttalli* beim Schaf unter den Bedingungen der Mongolischen Volksrepublik [Berlin, Humboldt-Univ., Diss., 1983]. Maschinenschr. vervielf.
- Uilenberg, G. (2006) *Babesia*--a historical overview. *Vet Parasitol*, 138(1-2), 3-10.
- Wagemakers, A., Staarink, P. J., Sprong, H. und Hovius, J. W. (2015) *Borrelia miyamotoi*: a widespread tick-borne relapsing fever spirochete. *Trends Parasitol*, 31(6), 260-269.
- Walder, G., Lkhamsuren, E., Shagdar, A., Bataa, J., Batmunkh, T., Orth, D., Heinz, F. X., Danichova, G. A., Khasnatinov, M. A., Wurzner, R. und Dierich, M. P. (2006) Serological evidence for tick-borne encephalitis, borreliosis, and human granulocytic anaplasmosis in Mongolia. *Int J Med Microbiol*, 296 Suppl 40, 69-75.
- Walker, J. B. (1987) The Tick Vectors of *Cowdria-Ruminantium* (Ixodoidea, Ixodidae, Genus *Amblyomma*) and Their Distribution. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 54(3), 353-379.
- Watts, J. G., Playford, M. C. und Hickey, K. L. (2016) *Theileria orientalis*: a review. *N Z Vet J*, 64(1), 3-9.
- Wells, S. J., Trent, A. M., Robinson, R. A., Knutson, K. S. und Bey, R. F. (1993) Association between Clinical Lameness and *Borrelia-Burgdorferi* Antibody in Dairy-Cows. *American Journal of Veterinary Research*, 54(3), 398-405.
- Wilm, A., Mainz, I. und Steger, G. (2006) An enhanced RNA alignment benchmark for sequence alignment programs. *Algorithms Mol Biol*, 1, 19.
- Woldehiwet, Z. (2010) The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol*, 167(2-4), 108-122.
- Xia, X. (2013) DAMBE5: a comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Mol Biol Evol*, 30(7), 1720-1728.

- Xia, X. und Lemey, P. (2009) 'Assessing substitution saturation with DAMBE' in P, L., M, S. und AM, V., eds., The phylogenetic handbook, Cambridge: Cambridge University Press, 615–630.
- Xia, X., Xie, Z., Salemi, M., Chen, L. und Wang, Y. (2003) An index of substitution saturation and its application. *Mol Phylogenet Evol*, 26(1), 1-7.
- Ybanez, A. P., Sivakumar, T., Battsetseg, B., Battur, B., Altangerel, K., Matsumoto, K., Yokoyama, N. und Inokuma, H. (2013) Specific molecular detection and characterization of *Anaplasma marginale* in Mongolian cattle. *J Vet Med Sci*, 75(4), 399-406.
- Zaugg, J. L. (1986) Experimental anaplasmosis in American bison: persistence of infections of *Anaplasma marginale* and non-susceptibility to *A. ovis*. *J Wildl Dis*, 22(2), 169-172.
- Zivkovic, Z., Nijhof, A. M., de la Fuente, J., Kocan, K. M. und Jongejan, F. (2007) Experimental transmission of *Anaplasma marginale* by male *Dermacentor reticulatus*. *BMC Vet Res*, 3, 32.

9 Anhang

9.1 Liste der untersuchten Herden

Tab. 32: Untersuchte Herden

Nr.	Somon	Koordinaten	Probenzahl	Vegetationsart	Tierzahl
H 001	Delgerchaan	N 47°06.535' E 109°07.884'	8	Steppe	36
H 002	Delgerchaan	N 47°05.452' E 109°06.240'	8	Steppe	70
H 003	Delgerchaan	N 47°01.059' E 109°00.874'	8	Steppe	65
H 004	Delgerchaan	N 47°02.475' E 109°01.564'	8	Steppe	57
H 005	Delgerchaan	N 47°00.880' E 108°58.662'	8	Steppe	100
H 006	Delgerchaan	N 47°03.150' E 108°52.620'	7	Steppe	15
H 007	Delgerchaan	N 47°07.320' E 109°06.216'	9	Steppe	21
H 008	Delgerchaan	N 47°06.012' E 109°11.232'	8	Steppe	35
H 009	Delgerchaan	N 47°04.905' E 109°10.571'	8	Steppe	65
H 010	Delgerchaan	N 47°06.431' E 109°13.369'	6	Steppe	32
H 011	Tsenchermandal	N 47°36.133' E 109°08.622'	2	Steppe	37
H 012	Tsenchermandal	N 47°38.879' E 108°57.128'	8	Steppe	83
H 013	Tsenchermandal	Keine vorhanden	8	Steppe	43
H 014	Tsenchermandal	N 47°39.931' E 108°54.639'	8	Waldsteppe	76

Anhang

Nr.	Somon	Koordinaten	Probenzahl	Vegetationsart	Tierzahl
H 015	Tsenchermandal	N 47°40.751' E 108°49.683'	8	Steppe	?
H 016	Tsenchermandal	N 47°39.771' E 108°49.207'	8	Steppe	55
H 017	Tsenchermandal	N 47°37.699' E 108°41.901'	8	Steppe	36
H 018	Tsenchermandal	N 47°45.541' E 109°16.214'	8	Steppe	63
H 019	Tsenchermandal	N 47°41.846' E 109°13.924'	8	Steppe	42
H 020	Tsenchermandal	Keine vorhanden	8	Steppe	49
H 021	Tsenchermandal	N 47°40.110' E 109°09.961'	8	Steppe	65
H 022	Dschargaltchaan	N 47°38.700' E 109°28.427'	8	Steppe	11
H 023	Dschargaltchaan	N 47°38.308' E 109°29.267'	8	Steppe	42
H 024	Dschargaltchaan	N 47°42.733' E 109°31.351'	8	Steppe	75
H 025	Dschargaltchaan	N 47°43.705' E 109°32.749'	8	Steppe	59
H 026	Dschargaltchaan	N 47°41.260' E 109°38.233'	8	Steppe	83
H 027	Dschargaltchaan	N 47°41.260' E 109°38.233'	8	Steppe	42
H 028	Dschargaltchaan	N 47°25.209' E 109°44.383'	8	Steppe	28
H 029	Dschargaltchaan	N 47°17.019' E 109°48.909'	8	Steppe	23
H 030	Dschargaltchaan	N 47°17.084' E 109°44.230'	8	Steppe	35
H 031	Dschargaltchaan	N 47°26.434' E 109°44.100'	8	Steppe	20
H 032	Binder	N 48°20.462' E 110°30.738'	8	Steppe	105
H 033	Binder	N 48°20.272' E 110°35.992'	8	Steppe	108
H 034	Binder	N 48°15.015' E 110°48.292'	8	Steppe	103

Anhang

Nr.	Somon	Koordinaten	Probenzahl	Vegetationsart	Tierzahl
H 035	Binder	N 48°38.998' E 110°34.011'	8	Waldsteppe	43
H 036	Binder	N 48°39.371' E 110°35.314'	8	Waldsteppe	34
H 037	Binder	N 48°40.669' E 110°47.444'	8	Waldsteppe	56
H 038	Binder	N 48°41.415' E 110°47.276'	8	Steppe	71
H 039	Binder	N 48°40.580' E 110°45.525'	8	Steppe	45
H 040	Binder	N 48°41.611' E 110°45.370'	8	Steppe	48
H 041	Binder	N 48°43.369' E 110°44.054'	8	Steppe	26
H 042	Bajan-Adarga	N 48°23.088' E 111°22.327'	8	Steppe	30
H 043	Dadal	N 48°52.920' E 111°35.924'	8	Steppe	24
H 044	Dadal	N 48°53.717' E 111°33.210'	8	Waldsteppe	54
H 045	Dadal	N 48°55.927' E 111°28.481'	8	Waldsteppe	90
H 046	Dadal	Keine vorhanden	8	Waldsteppe	66
H 047	Dadal	Keine vorhanden	8	Waldsteppe	?
H 048	Dadal	N 49°02.170' E 111°27.329'	8	Waldsteppe	25
H 049	Dadal	N 49°03.637' E 111°37.793'	8	Waldsteppe	63
H 050	Dadal	N 48°58.487' E 111°37.570'	8	Waldsteppe	66
H 051	Bajan-Adarga	N 48°32.055' E 111°36.621'	8	Steppe	96
H 052	Bajan-Adarga	N 48°32.400' E 111°35.065'	8	Steppe	37
H 053	Dadal	N 48°41.260' E 111°20.332'	8	Steppe	74
H 054	Dadal	N 48°41.122' E 111°17.064'	8	Waldsteppe	35

Anhang

Nr.	Somon	Koordinaten	Probenzahl	Vegetationsart	Tierzahl
H 055	Bajan-Adarga	N 48°40.480' E 111°14.684'	8	Waldsteppe	126
H 056	Bajan-Adarga	N 48°38.480' E 111°09.528'	8	Waldsteppe	86
H 057	Bajan-Adarga	N 48°38.480' E 111°09.528'	8	Waldsteppe	44
H 058	Bajan-Adarga	N 48°26.358' E 110°52.059'	8	Steppe	70
H 059	Bajan-Adarga	N 48°17.815' E 111°04.493'	8	Steppe	28
H 060	Bajan-Adarga	in der Nähe von H061	8	Steppe	153
H 061	Bajan-Adarga	N 48°14.563' E 110°59.925'	8	Steppe	80

9.2 Liste der gefangenen Nager

Tab. 33: Liste der gefangenen Nager, die auf juvenile Zeckenstadien untersucht wurden mit Fundort und Anzahl abgesammelter Zeckenlarven sowie deren Zustand

Nr. des Nagers	Somon	Koordinaten	Anzahl abgesammelter Zeckenlarven	davon Zeckenlarven nicht beschädigt	davon Zeckenlarven beschädigt
I.1	Bajan-Adarga	N 48°15.973' E 111°04.068'	8	8	0
I.2	Bajan-Adarga	N 48°15.973' E 111°04.068'	11	2	9
I.3	Bajan-Adarga	N 48°15.973' E 111°04.068'	4	2	2
I.4	Bajan-Adarga	N 48°15.973' E 111°04.068'	11	9	2
I.5	Bajan-Adarga	N 48°15.973' E 111°04.068'	11	10	1
I.6	Bajan-Adarga	N 48°15.973' E 111°04.068'	1	1	0
I.7	Bajan-Adarga	N 48°15.973' E 111°04.068'	0	0	0
I.8	Bajan-Adarga	N 48°15.973' E 111°04.068'	1	0	1
I.9	Bajan-Adarga	N 48°15.973' E 111°04.068'	4	3	1
I.10	Bajan-Adarga	N 48°15.973' E 111°04.068'	5	2	3
II.1	Dschargaltchan	N 47°28.361' E 109°27.352'	3	1	2
III.1	Dschargaltchan	N 47°31.620' E 109°27.060'	22	16	6
III.2	Dschargaltchan	N 47°31.620' E 109°27.060'	18	18	0
III.3	Dschargaltchan	N 47°31.620' E 109°27.060'	8	8	0
III.4	Dschargaltchan	N 47°31.620' E 109°27.060'	30	27	3

Anhang

IV.1	Dschargaltchan	N 47°27.466' E 109°26.043'	2	2	0
IV.2	Dschargaltchan	N 47°27.466' E 109°26.043'	4	4	0
IV.3	Dschargaltchan	N 47°27.466' E 109°26.043'	15	8	7
V.1	Dschargaltchan	N 47°29.602' E 109°28.988'	19	16	3
V.2	Dschargaltchan	N 47°29.602' E 109°28.988'	4	4	0
V.3	Dschargaltchan	N 47°29.602' E 109°28.988'	1	1	0
VI.1	Dschargaltchan	N 47°30.879' E 109°29.597'	20	18	2
VI.2	Dschargaltchan	N 47°30.879' E 109°29.597'	29	26	3
VI.3	Dschargaltchan	N 47°30.879' E 109°29.597'	18	14	4
Summe der Zeckenlarven			249	200	49

9.3 Herdenfragebogen

Herdenfragebogen

Herdennr. _____

Aimag _____

Somon _____

Koordinaten _____

Name des Viehzüchters _____

Vorname des Viehzüchters _____

Datum _____

Vegetationsgebiet _____

Anzahl der Rinder _____

Antiparasitäre Behandlung

Nein ___ Ja ___ Wann? _____ Was? _____

Ernährungszustand der Herde

Schlecht ___ Mittelmäßig ___ Gut ___

Hämoglobinurie

Nein ___ Ja ___

Krankheiten

Welche und wann?

Mortalitäten

Wie viele und wann; Grund des Todes, wenn bekannt; Alter der verstorbenen Tiere?

Auffälligkeiten

9.4 Für die phylogenetische Analyse verwendete Gensequenzen der gefundenen *Anaplasma* sp.

16S

CATGCAGTCGAACGGACCGTATATGCAGCTTGCTGCGTATACGGTTAGTGGCAGA
CGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTGCCTAGTAGTATAGGATAGCCACTAGAAAT
GGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGGAAAGATTTATCGYTACTAGATGAG
CCTATGTCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCCACCAAGGCGGTGATCTGT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGC
TATGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAAGTCTTTCAGTAGGGAAG
ATAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAAGTCCGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTA
GGCGGTTTGGTAAGTTAAAGGTGAAATACCAGGGCTTAACCCTGGGGCTGCTTTT
AATACTGCAGGACTAGAGTCCGGAAGAGGATAGCGGAATTCCTAGTGTAGAGGT
GAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCCG
GTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG
TAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTGCTGAATGTGGGGGCTTTTGCCTCTGTGTTGT
AGCTAACGCGTTAAGCACTCCGCCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAAAAGTCA
AAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGC
AACGCGAAAAACCTTACCCTTCTTGACATGGAGGCTAGATCCTTCTTAACGGAA
GGGCGCAGTTCGGCTGGGCCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGTAACCCTCATCCTTAGTTACC
AGCGGGTAATGCCGGGCACTTTAAGGAAAGTGGCAGTGATAAAAGTGGAGGAAGG
TGGGGATGATGTCAAGTCAGCACGGCCCTTATGGGGTGGGCTACACACGTGCTAC
AATGGCGACTACAATAGGTTGCAACGTCGCAAGGCTGAGCCAATCCGTAAAAGT
CGTCTCAGTTCGGATTGTCCTCTGTAAGTTCGAGGGCATGAAGTCGGAATCGCTAG
TAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTGTACACACTGC
CCGTCACGCCATGGGAATTGGCTTAACTCGAAGCTGGTGCGCCAACCGTAAGGAG
GCAGCCATTTAAGGTTGGGTTCGGTACTGGGGGAAGTCGTA

GroEL

ATAATCGCTAAGGAGGCGTAGTCCGACGCGCAGGTTTGGTTCGTTAAGTTTGATT
TAGGAGGTTATAAATGGCAAATGTTGTTGTTACGGGCGAAGCATTAGATAAATCT
ATAAGGGAGGTGGTGCGCATCCTGGAGGACGCTGTTGGTTGCACCGCCGGCCCA
AAGGGGCTCACCGTCGCTATTAGCAAGCCTTACGGGTCCCCGGAGATCACCAAGG
ACGGGTATAAGGTCATGAAAAGCATAAAGCCTGAGGAGCCCTTGGCGGTTGCTA
TCGCGAACATAATTACTCAGAGTGCGTCTCAATGCAACGATAAAGGTCGGTGACGG
AACCACCACGTGCTCCATACTGACTGCAAAGTTATCGAGGAGGTGTCCAAGGCC
AAGGCAGCCGGCGCTGATATAATAAGCATAAAAAATGGGATCTTAAAAGCCAAG
GAGGCTGTGCTTACAGCTTTGCTGTCAATGAAGCGTGAAGTGGCATCTGAGGACG
AAATCGCACAGGTCGCTACTATATCTGCCAACGGGGACAAAAACATAGGCGGCA
AAATAGCACAGTGTGTCAGGGAAGTTGGCAAAGATGGGGTGATAACGGTAGAGG
AGAGCAAGGGGTTCAAGGACCTCGAGGTCGAAAGGACTGACGGTATGCAGTTTG
ACCGCGGATACCTGTCCCCTTACTTCGTAACCTAACGCTGAGAAGATGTTGGTAGA
GTTTCGAGAATCCGTACATATTCCTGACTGAAAAGAAAATCAATCTAGTACAAAAC
ATACTGCCAGTACTGGAGAATGTTGCTAGGTCAGGAAGGCCATTGCTGATCGTCCG
CGGAGGACGTAGAGGGTGAGGCGCTAAGTACACTGGTGCTTAACAAGCTGCGCG
GGGGCCTGCAGGTTGCGGCTGTTAAAGCACCCGGTTTCGGCGACAGAAGAAAGG
ACATGCTCGGCGATATTGCTGTAATAGCTGGTGCAAAGTATGTGGTAAACGACGA
GCTTGCGGTAAAGGTTGAGGACATAACTCTGGAAGATCTCGGTACTGCCAAGACT
GTACGCATCACTAAGGACACAACCACAATCATAGGAAGCGTCGACAGCAACGCC
GATAGTATCACCAGCAGGATTAGCCAGATTAAGTCCCAGATTGAGGTTTCTTCTT
CTGATTACGACAAGGAAAAGTTGAAGGAGAGGCTAGCAAAGCTCTCAGGCGGGG
TTGCCGTACTTAAGGTTGGTGGCTCTAGTGAAGTTGAGGTCAAAGAGCGTAAGGA
TAGGGTCGAAGATGCTCTGCATGCGACTAGGGCCGCGGTTCGAGGAAGGCGTGGT
ACCCGGCGGTGGGGCTGCCTTGCTGTATACGCTCGCATCTCTGGACGGCGTAAAA
GGGAAGAATGATGATGAGCAGCTGGGTGTCAATATAATAAAGCGCGCTGTTTGT
GCCCCAATAAAGAGGATCATCAAAAATTCCGGATCCGAAGAGGCTCCATGTGTTA
TCCAGCACTTGCTGAAGCAGAACGACAAAGAGCTTATCTTCAATGTTGACACCAT
GAACTACGCCAACGCGTTCGCTTCCGGGGTTATGGACCCTCTAAAGGTGGTGCGC
ATCGCGTTTGACTTGGCTGTGTCACTCGCGGCTGTATTCATGACTTTAAACGCAGT
GGTTGTGGACGTCCCCAACAAGGAAGATGCAACGGGCG

MSP5

ATGAGAATTTTCAAGATTGTGTCTAACCTTCTGCTGTTTCGTTGCTGCCGTGTTTCCT
GGGGTATTCCTATGTGAACAAGAAGGGCATTTCAGCAAAATCGGCGAGAGGTTCC
ACCACCTCCGAAGTTGCGAGCGAGGGGCATAGCCTCCGCATCTTTCAGCAATTTAA
TTAACCATGAGGGGGCCACCGTCAGTAGCAGCGATTTTGGCGGCAAGCATATGCT
GGTGATGTTTCGGCTTTTCGGCCTGCAAGCGCACGTGCCCTGCCGAGTTGGGAATG
GCCTCTCAGCTCCTAAATAGGCTAGGCGACCATGCCGATAAGCTGCAAGTTGTGT
TCATAACTGTTGATCCGAAGAATGACACCGTAGCCAAGCTGAGGGAGTATCACA
GGGCTTTCGATGCAAGGATTCAGATGCTAACAGGTGAGGAGGCAGACATAAAGA
GCGCGGTCGAAAACCTACAAGGTGTACGTGGGTGACAAAAAGGCAAGCGATGGTG
ATATCGATCACTCAACCTTCATGTACCTCATTAATGGAAAAGGCGAGTATGTTGG
GCATTCGCACCAGATTTTAACGCGTCTGAGGGCCAAGGCGAGGAGCTACTCAAG
TTTGTTAGCGGTCACATGCTTAATTCTTAGTTTAGTTAAGCATGGTAGCGGTACAG
TTTCGCGTGTTGTCCTTGGTGAGGAGGCAGTAGGAAGTATGGTGGGGCTTTGGGG
GTTTTCTTTTGTGGCGCTTGTCGCGCTTGCGTTAGAGGCTGGAGCTGATCAGATTA
GGGTAGTCGGCTCTTCTACCGTGTTCCCCTTTATTTCTTCTGTGCTGAGGAGTTC
GGTAGGTCTCCGCCTATAGAACCCCGTCATAGGATCGT

10 Publikationsverzeichnis

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Fischer, T., Gonchigoo, B, Baumann, M., Clausen, P.-H., Nijhof, A.M. (2014). Zecken und durch Zecken übertragbare Krankheitserreger in Chentii Aimag, Mongolei – Tagung der DVG-Fachgruppe „Parasitologie und Parasitäre Krankheiten“, 30. Juni - 2. Juli 2014 in Leipzig

Fischer, T., Gonchigoo, B., Zayat B., Baumann M., Myalkhaa, M., Clausen, P.-H., Nijhof A.M. (2016). Ticks and tick-borne pathogens of cattle in Khentii District, Mongolia – AITVM-STVM Tagung, 4.-8. September 2016 in Berlin

11 Danksagung

Ich möchte mich als erstes bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Henning Clausen bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat über dieses Thema zu promovieren. Vielen Dank für Ihr Vertrauen in meine Person und ihre stete Unterstützung meiner Arbeit. Auch möchte ich mich für die Organisation der Studienreise 2011 in die Monoglei bedanken, die überhaupt mein Interesse an der untersuchten Thematik geweckt hat.

Vor allem möchte ich mich bei PhD Ard Nijhof bedanken, der mir mit seiner fachlichen Kompetenz und seiner herzlichen Art während aller Phasen meiner Arbeit immer verlässlich zur Seite stand. Auch in schweren Phasen meiner Arbeit hast du nie einen Zweifel am erfolgreichen Ende aufkommen lassen.

Auch möchte ich mich bei Dr. Maximilian Baumann bedanken, der mich bei der epidemiologischen Planung meiner Arbeit mit seiner Erfahrung und seinem Fachwissen unterstützt hat.

Dem DAAD möchte ich an dieser Stelle für ihre finanzielle Unterstützung während meines Auslandsaufenthaltes danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Battsetseg Gonchigoo und Prof. Batsukh Zayat, die mich an der mongolischen Hochschule bei der Organisation der Feldarbeit immer zuverlässig unterstützt haben.

Mungunbariya Myalkhaa und seiner wundervollen Familie möchte ich für ihre unglaubliche Gastfreundschaft danken und mich für alle Unannehmlichkeiten und Entbehrungen entschuldigen, die er und seine gesamte Familie während meines Aufenthaltes in Kauf nehmen mussten. Ohne Mungunbariyas tatkräftige und unermüdliche Unterstützung während der gesamten Zeit der Feldarbeit wäre die Studie nicht möglich gewesen.

Tuvshinzaya und Boina möchte ich für ihr grenzenloses Engagement danken. Ihr seid mir während der Probensammlung und bei einigen Abenteuern unentbehrliche Helfer gewesen.

Mein Dank gilt zudem allen mongolischen Nomaden, die ihre Tiere für diese Studie zur Verfügung stellten und mich teilweise auch bei der Probensammlung selber tatkräftig unterstützten. Maschich Bairlaa!

Ich möchte mich auch bei den lokalen Tierärzten bedanken, die mich dank ihrer Ortskenntnisse zu den nicht immer einfach zu findenden Nomaden und deren Herden führten.

Ich möchte mich zudem bei allen Mitarbeitern des Instituts für Parasitologie der Mongolian State University of Agriculture für ihre freundliche Aufnahme und ihre zahlreichen kleinen Hilfestellungen bedanken.

Auch gilt mein Dank den Mitarbeitern des Instituts für Parasitologie und Topenveterinärmedizin der FU Berlin für ihre vielen Hilfestellungen bei meinen Laborarbeiten. Es war eine schöne Zeit mit euch.

Ich danke allen meinen Freunden für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre Geduld mit mir, wenn ich sie aufgrund der Arbeit vernachlässigt habe.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Gisela und Manfred, ich hätte diese Arbeit ohne euch nicht erfolgreich beenden können. Ich danke euch von ganzem Herzen, dass ihr mir in allen erdenklichen Bereichen immer zur Seite gestanden und mich, wo es nur ging, unterstützt habt. Julian ich danke dir für dein stets offenes Ohr für meine Probleme, die aufbauenden Gespräche und deine moralische Unterstützung.

Nora, ich danke dir für deine liebevolle Unterstützung und für deine motivierenden Worte sowie dein Verständnis für Einschränkungen und Entbehrungen, die du während meiner Arbeit in Kauf nehmen musstest.

12 Selbstständigkeitserklärung

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

Berlin, den 27.02.2018

Timon Fischer



9 783863 878900
mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-890-0