

**Epidemiologische Studie zu zeckenübertragenen
Krankheitserregern in *Ixodes ricinus* aus
bayerischen Parkanlagen**



Sabine Cornelia Poljak

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von Univ.-Prof. Dr. Kurt Pfister

**Epidemiologische Studie zu
zeckenübertragenen Krankheitserregern
in *Ixodes ricinus* aus bayerischen
Parkanlagen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Sabine Cornelia Poljak

geb. Schorn

aus Wolfratshausen

München 2012

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Pfister

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Mansfeld
Priv.-Doz. Dr. Fischer
Univ.-Prof. Dr. Hartmann
Univ.-Prof. Dr. Straubinger

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

Die vorliegende Arbeit wurde nach § 6 Abs. 2 der Promotionsordnung für die
Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München als
kumulative Dissertation gestaltet.

Für Daniel

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 <i>IXODES RICINUS</i>	3
2.1.1 Taxonomie	3
2.1.2 Geographische Verbreitung und Habitate.....	4
2.1.3 Lebenszyklus, Wirtsspektrum und Saisonalität	4
2.1.4 Rolle als Vektor	6
2.2 <i>BABESIA SPP.</i>	8
2.2.1 Taxonomie und Morphologie	8
2.2.2 Entwicklungszyklus, Vektor, Reservoir und Verbreitung von <i>Babesia divergens</i> , <i>Babesia microti</i> und <i>Babesia sp. EU1</i>	8
2.2.3 Klinik von <i>Babesia divergens</i> , <i>Babesia microti</i> und <i>Babesia sp. EU1</i>	10
2.3 <i>ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM</i>	12
2.3.1 Taxonomie und Morphologie	12
2.3.2 Entwicklungszyklus, Vektor, Reservoir und Verbreitung	13
2.3.3 Klinik	14
2.4 <i>RICKETTSIA SPP. (ZECKENBISSFIEBER-GRUPPE)</i>	17
2.4.1 Taxonomie und Morphologie	17
2.4.2 Entwicklungszyklus, Vektor, Reservoir und Verbreitung	18
2.4.3 Klinik	19
2.5 <i>BARTONELLA SPP.</i>	21
2.5.1 Taxonomie und Morphologie	21
2.5.2 Entwicklungszyklus, Vektor, Reservoir und Verbreitung von <i>Bartonella spp.</i> in <i>Ixodes ricinus</i>	21
2.5.3 Klinik von <i>Bartonella henselae</i>	23
3 MATERIAL UND METHODEN	24
3.1 STANDORTAUSWAHL.....	24
3.1.1 München.....	24
3.1.2 Regensburg.....	26
3.1.3 Ingolstadt.....	27
3.1.4 Augsburg.....	28
3.1.5 Berg am Starnberger See	29
3.2 PROBENNAHME	29

3.3	LABORUNTERSUCHUNGEN.....	30
3.3.1	Zeckenbestimmung	30
3.3.2	Molekularbiologische und bioinformatische Methoden zur Identifikation von Pathogen-DNA in <i>Ixodes ricinus</i>	30
3.3.2.1	DNA-Isolierung.....	30
3.3.2.2	Polymerase Kettenreaktion	31
3.3.2.2.1	Untersuchung auf DNA von <i>Babesia</i> spp.....	31
3.3.2.2.2	Untersuchung auf DNA von <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	32
3.3.2.2.3	Untersuchung auf DNA von <i>Rickettsia</i> spp.	34
3.3.2.2.4	Untersuchung auf DNA von <i>Bartonella</i> spp.	36
3.3.2.3	Agarose Gelelektrophorese und DNA-Aufreinigung	36
3.3.2.4	Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	37
3.4	STATISTIK	37
3.5	ERSTELLUNG RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHER AUFNAHMEN VON <i>IXODES FRONTALIS</i>	38
4	ERGEBNISSE	39
4.1	ANZAHL GESAMMELTER ZECKEN.....	39
4.2	ZECKENDICHTE.....	40
4.3	NANO DROP	41
4.4	PUBLIKATIONEN	41
4.4.1	Publikation 1	43
4.4.2	Publikation 2	67
4.4.3	Publikation 3	91
5	DISKUSSION	100
6	SCHLUSSFOLGERUNG	110
7	ZUSAMMENFASSUNG	111
8	SUMMARY	112
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	113
10	ABBILDUNGEN	146
11	TABELLEN.....	147
12	ANHANG	149
12.1	MATERIAL	149
12.1.1	Geräte.....	149
12.1.2	Kits, Oligonukleotide, Enzyme, Chemikalien und Gase	149
12.2	SEQUENZEN	150
12.2.1	Sequenzvergleich des <i>18S rRNA</i> Gens von <i>Babesia</i> sp. EU1	150

12.2.2	Sequenzvergleich des <i>18S rRNA</i> Gens von <i>Babesia divergens</i>	151
12.2.3	Sequenzvergleich des <i>18S rRNA</i> Gens von <i>Babesia divergens/capreoli</i>	152
12.2.4	Sequenzvergleich des <i>18S rRNA</i> Gens von <i>Babesia gibsoni-like</i>	153
12.2.5	Sequenzvergleich des <i>16S rRNA</i> Gens von <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	153
12.2.6	Sequenzvergleich des <i>gltA</i> Gens von <i>Rickettsia helvetica</i>	155
12.2.7	Sequenzvergleich des <i>ompB</i> Gens von <i>Rickettsia monacensis</i> IrR/Munich.....	155
12.3	TABELLEN MIT ROHDATEN	157
13	DANKSAGUNG	161

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aqua dest.	Destilliertes Wasser
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ct-Wert	Schwellenwert-Zyklus
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
<i>gltA</i>	Citrat Synthase Gen
H ₂ O	Wasser
IFAT	Immunfluoreszenz-Antikörper-Test
km	Kilometer
km ²	Quadratkilometer
m ²	Quadratmeter
<i>msp</i>	Oberflächenprotein (engl. major surface protein)
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
ml	Milliliter
min	Minute
n	Anzahl
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NH ₃	Ammoniak
<i>ompB</i>	Oberflächenprotein (engl. outer membrane protein B)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
sek	Sekunde
SFG	Fleckfiebergruppe (engl. Spotted Fever Group)
syn.	Synonym
TAE	Tris-Acetat-EDTA
U	Einheit (engl. Unit)
u. a.	unter anderem

1 Einleitung

Parkanlagen stellen wichtige Einrichtungen städtischer Naherholung dar. Sie werden besonders in den warmen Monaten des Jahres intensiv für eine Vielzahl an freizeithlichen Aktivitäten genutzt. Sie können aber auch als eng umschriebene Ökosysteme betrachtet werden, deren Flora und Fauna sich durch den starken Einfluss des Menschen von naturbelassenen Grünflächen unterscheiden können. In vorangegangenen Studien konnte festgestellt werden, dass der Starkpark als Habitat für Zecken und zeckenübertragene Pathogene eine besondere Rolle zu spielen vermag (Comer et al., 2001; Hunfeld und Brade, 1999; Uspensky, 2008). Für *Borrelia burgdorferi* sensu lato, den Erreger der Lyme Borreliose, wird ein urbaner Lebenszyklus diskutiert, der sich von dem sylvatischen Lebenszyklus bezüglich der Prävalenz in *Ixodes (I.) ricinus* und dem Vorkommen artspezifischer Wirtstiere unterscheidet (Junttila et al., 1999; Kurtenbach et al., 2002; Reye et al., 2010). Des Weiteren konnten für den bakteriellen Krankheitserreger *Anaplasma (A.) phagocytophilum* signifikant höhere Prävalenzen in einem Stadtpark in München („Englischer Garten“) ermittelt werden als in untersuchten süddeutschen Waldgebieten (Leonhard, 2005; Silaghi et al., 2008a). Ein gegenteiliges Bild zeigte sich dabei für Rickettsien der Fleckfiebergruppe, welche geringere Infektionsraten in Zecken aus bayerischen urbanen Flächen aufwiesen verglichen mit naturbelassenen Grünflächen (Silaghi et al., 2008b). Dies zeigt, dass in verschiedenen Habitaten aufgrund biotischer und abiotischer Faktoren ein unterschiedlich hohes Risiko bestehen kann, mit einer infizierten Zecke in Kontakt zu kommen. Es stellte sich jedoch die Frage, ob solche Prävalenzunterschiede zeckenübertragener Pathogene auch in anderen bayerischen Stadtparks vorkommen können oder ob dies ausschließlich ein Phänomen im Englischen Garten in München ist.

Für eine adäquate zukünftige Risikoabschätzung bezüglich zeckenübertragener Krankheitserreger beim Menschen und dessen Begleittieren in städtischen Bereichen sind fundierte epidemiologische Daten zu unterschiedlichen Zeckenhabitaten, Zeckendichte und Prävalenzen übertragbarer Pathogene eine nötige Grundvoraussetzung. Aktuell sind für Deutschland und im Besonderen für städtische Flächen nur wenige Daten vorhanden. Ziele dieser Studie waren daher:

- (i) Das Vorkommen von Zecken sowie die Zeckendichte (Adulte und Nymphen/100m²) in ausgewählten städtischen Grünanlagen in Bayern zu untersuchen.
- (ii) Die Prävalenzen von *Babesia (B.)* spp, *A. phagocytophilum*, *Rickettsia (R.)* spp. und *Bartonella (B.)* spp. in *I. ricinus* zu bestimmen und Coinfektionen darzustellen.
- (iii) Die Auswirkung geographischer und saisonaler Faktoren auf die Wahrscheinlichkeit einer infizierten Zecke sowie die Unterschiede der Infektionsrate bezüglich Entwicklungsstadien, Geschlecht und Jahr zu untersuchen.
- (iv) Genetische Varianten von *A. phagocytophilum* (16S rRNA Gen) zu ermitteln.

Ergebnisse dieser Studie sollen einen Beitrag zum aktuellen Wissensstand über die in Deutschland weit verbreitete Zeckenart *I. ricinus* liefern sowie über die durch sie übertragenen Krankheitserreger. Das Habitat „Stadtpark“ stellt dabei durch seinen hohen freizeithlichen Nutzwert eine besondere Grünfläche von human- und veterinärmedizinischem Interesse dar. Dies zeigt die Notwendigkeit einer systematischen Untersuchung dieses besonderen Ökosystems.

2 Literaturübersicht

2.1 *Ixodes ricinus*

2.1.1 Taxonomie

Taxonomisch werden Zecken innerhalb des Stammes Arthropoda zu der Klasse der Arachnida gezählt. Zusammen mit den Milben bilden sie die Unterklasse Acari. Aufgrund der Lage der Stigmenplatten werden Zecken in die Ordnung der Ixodida (= Metastigmata) eingegliedert, welche sich in drei Familien (Ixodidae, Agasidae und Nuttalliellidae) mit ca. 880 Arten unterteilt (Eckert et al., 2008; Sonenshine, 1991) (Abb. 1).

Abbildung 1: Taxonomie der Ordnung Ixodida (modifiziert nach Eckert et al. 2008)

ORDNUNG: Ixodida (Metastigmata)

FAMILIE: Ixodidae (Schildzecken)

U-FAMILIE: Ixodinae

GATTUNG: *Ixodes* (ca. 250 Arten)

U-FAMILIE: Haemaphysalinae

GATTUNG: *Haemaphysalis* (156 Arten)

U-FAMILIE: Rhipicephalinae

GATTUNG: *Rhipicephalus* (80 Arten)

U-GATTUNG: *Boophilus* (5 Arten)

GATTUNG: *Dermacentor* (35 Arten)

U-FAMILIE: Hyalomminae

GATTUNG: *Hyalomma* (25 Arten)

U-FAMILIE: Amblyomminae

GATTUNG: *Amblyomma* (140 Arten)

FAMILIE: Agasidae (Lederzecken)

U-FAMILIE: Argasinae

GATTUNG: *Argas* (56 Arten)

U-FAMILIE: Ornithodorinae

GATTUNG: *Carios* (88 Arten)

GATTUNG: *Ornithodoros* (37 Arten)

GATTUNG: *Otobius* (2 Arten)

FAMILIE: Nuttalliellidae

(U-Familie: Unterfamilie; U-Gattung: Untergattung)

2.1.2 Geographische Verbreitung und Habitate

I. ricinus, umgangssprachlich als „gemeiner Holzbock“ bezeichnet, ist die am häufigsten vorkommende Zeckenart in Europa (Jongejan und Uilenberg, 2004). Ihre Verbreitung erstreckt sich von Irland über Großbritannien und dem südlichen Skandinavien über annähernd ganz Europa bis nach Nordafrika mit Marokko, Algerien und Tunesien sowie nach Russland (Wolga), Turkmenistan und dem nördlichen Iran (Kolonin, 2009; Sonenshine, 1993). Überdies kann diese Zeckenart bis zu einer Höhe von 2.000 Meter über dem Meeresspiegel aufgefunden werden (Eckert et al., 2008; Sonenshine, 1993).

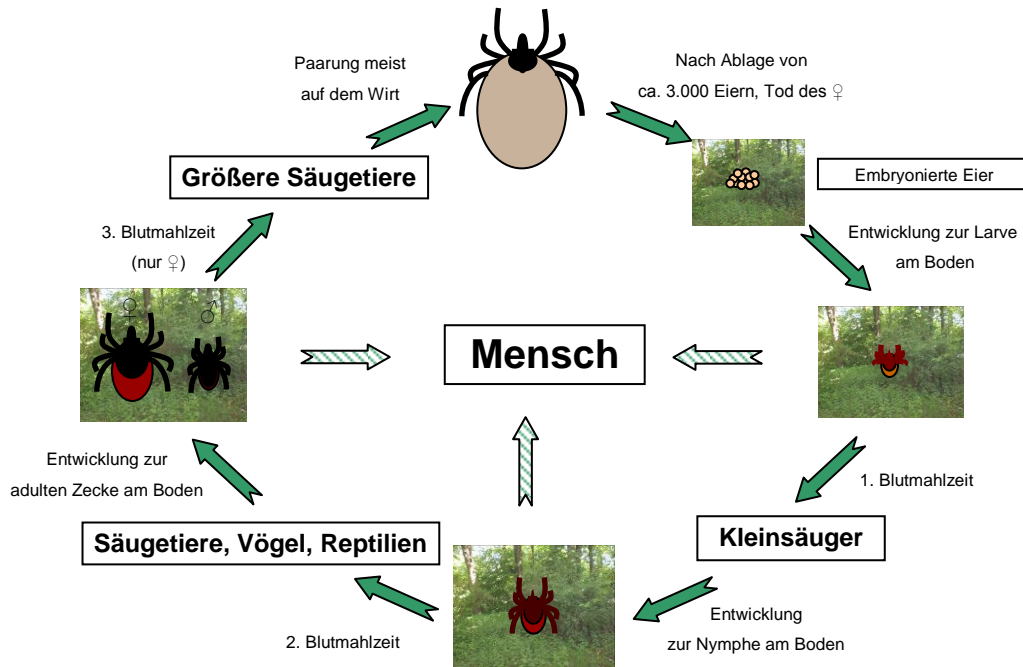
Laub- und Mischwälder mit einer stark ausgeprägten Kraut- und Strauchzone verkörpern bevorzugte Zeckenhabitate für *I. ricinus*. Bodennahe Vegetationen an Übergängen von Wiesen zu dichtem Untergestrüpp, an Waldlichtungen oder Waldwegen sowie durch Büsche beschattete Gebiete ohne dichten Baumbestand stellen dabei den geeigneten Lebensraum für die Zecke dar (Eckert et al., 2008; Sonenshine, 1993). Es ist entscheidend, dass eine relative Luftfeuchte von über 75% mit einer dichten permanent feuchten Detritusschicht (mit 95-100% relative Feuchte) im Zeckenhabitat vorliegt, welche der Zecke einen adäquaten Schutz vor Austrocknung bietet (Eckert et al., 2008). Nüchterne Zecken wandern entlang des Bewuchses unterschiedlich weit hoch, abhängig von Entwicklungsstadium und Witterungszustand, um auf Wirtssuche zu gehen. Larven können dabei auf eine Höhe bis zu 20cm gefunden werden, Nymphen bis 1m und adulte Zecken bis 1,50m (Süss und Schrader, 2004).

2.1.3 Lebenszyklus, Wirtsspektrum und Saisonalität

I. ricinus hat einen drei-wirtigen Lebenszyklus mit vier Entwicklungsstadien: embryoniertes Ei und drei aktive Stadien (Larve, Nymphe und Adult) (Abb. 2). Zu jeder der drei Blutmahlzeiten, die diese obligat hämatophage Zecke im Laufe ihres Lebens zu sich nimmt, wird ein anderes Wirtstier aufgesucht (Sonenshine, 1991). Bis zu 300 verschiedene Wirbeltierarten können dabei als Wirt fungieren (Stanek, 2009). Die Hauptwirte für Larven sind meist Kleinsäuger, z. B. Rötelmaus (*Myodes glareolus*) oder Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*), für Nymphen Kleinsäuger aber auch Vögel, im besonderen Amsel (*Turdus merula*), Reptilien und größere Säugetiere wie z. B. das Reh (*Capreolus capreolus*). Adulte

Zecken finden sich häufig auf verschiedenen größeren Säugern. Alle drei blutsaugenden Entwicklungsstadien sind auch beim Menschen auffindbar (Eckert et al., 2008; Lucius und Loos-Frank, 2008).

Abbildung 2: Lebenszyklus von *Ixodes ricinus*



Alle Entwicklungsstadien verfügen über das Haller'sche Organ, ein Sinnesorgan am Tarsus des ersten Beinpaars, welches der Wirtsfindung dient. Damit können Lockstoffe wie CO₂, NH₃, Buttersäure und Milchsäure detektiert werden. Auch die Körperwärme und andere Körpergerüche des potentiellen Wirtes können als Stimuli wirken (Sonenshine, 1993). Ist ein passender Wirt gefunden, werden reich durchblutete Körperstellen bevorzugt (beim Mensch z.B. Achsel, Haaransatz und Inguinalregion; beim Tier z. B. die Ohren) (Süss und Schrader, 2004). Ist eine geeignete Stelle mittels der Pedipalpen, der Tastorgane, gefunden, wird die Haut mit den scharfen Chelizeren angeritzt und das Hypostom zur Verankerung in die Haut vorgeschoben (Lucius und Loos-Frank, 2008). Dabei produzieren die Speicheldrüsen der Zecke Stoffe zur Verhinderung der Hämostase (Apyrase, Prostaglandine, Prostacyclin, Antikoagulantia) sowie Stoffe zur Hemmung der Entzündung („Zement“, Antihistaminika, Capoxypeptidase und Anästhetika) (Eckert et al., 2008; Parola und Raoult, 2001). Dies erlaubt der Zecke die benötigte Zeit von mehreren Tagen ungestört am Wirtstier zu saugen (Sonenshine,

1991). Die weibliche adulte Zecke kann beim Saugakt ihre Körpermasse auf das 120-fache vergrößern. Die männliche adulte Zecke saugt kein oder nur geringe Mengen Blut. Nach der Beendigung der Blutmahlzeit lässt sich die vollgesaugte Zecke vom Wirt abfallen und es kommt beim weiblichen adulten Tier zur Eiablage (Sonenshine, 1993).

Ein biphasisches Aktivitätsmuster mit zwei voneinander unabhängigen Zeckenpopulationen (Frühlings- und Herbstpopulation) bestimmt in den gemäßigten Klimazonen das jährliche Vorkommen von *I. ricinus* (Gardiner und Gettinby, 1983; Sonenshine, 1993). Bei einer Außentemperatur von mindestens 7°C zeigt sich die erste Zeckenaktivität im Frühjahr (Mai/Juni), gefolgt von einem Aktivitätsrückgang im Sommer und einem zweiten Aktivitätshoch im Herbst (September/Oktober) (Korenberg, 2000; Sonenshine, 1993; Süss et al., 2008). Faktoren wie die Verkürzung der Photoperiode und die schnellere Abkühlung der Außentemperatur im Herbst sind Gründe dafür, dass die Herbstaktivität im Gegensatz zur Frühlingsaktivität geringer ausfällt (Gardiner und Gettinby, 1983; Sonenshine, 1993). Abweichungen von diesem Aktivitätsmuster konnten abhängig vom untersuchten Habitaten sowie bei Temperaturänderungen (z.B. Reduktion auf ein Hoch pro Jahr bei kälteren Temperaturen) beobachtet werden (Korenberg, 2000). Daneben kann *I. ricinus* auch bei milden klimatisch Verhältnissen eine Aktivität in den Wintermonaten zeigen (Dautel et al., 2008). Der gesamte Entwicklungszyklus von *I. ricinus* kann zwischen 2 und 6 Jahren dauern. Die durchschnittliche Dauer beträgt drei Jahre (mit einer Blutmahlzeit pro Jahr), kann jedoch, abhängig von klimatischen Faktoren, verlängert oder verkürzt werden (Sonenshine, 1993). Die Diapause, ein neurohormonell bedingter Zustand geringer metabolischer Aktivität, ermöglicht es der Zecke sich auch bei geringem Wirtstieraufkommen oder ungünstigen klimatischen Bedingungen optimal anzupassen und einen längeren Zeitraum ohne Blutmahlzeit zu überleben (Sonenshine, 1993).

2.1.4 Rolle als Vektor

90 bis 95% aller zeckenübertragbaren menschlichen Erkrankungen werden in Europa durch *I. ricinus* ausgelöst (in Osteuropa durch *I. persulcatus*) (Süss et al., 2008). Neben den Krankheitserregern der Lyme Borreliose und der Frühsommer-

Meningoenzephalitis gibt es eine Reihe weiterer viraler, bakterieller und protozoärer Pathogene, die durch *I. ricinus* übertragen werden können (Tab. 1).

Tabelle 1: Krankheitserreger, die durch *Ixodes ricinus* übertragen werden (Auswahl) (modifiziert nach Eckert et al. 2008)

Erreger	Krankheit	Wirt*
Viren		
FSME-Virus	FSME	Msch, Säuger
Louping ill-Virus	Louping ill	Schaf (selten Msch)
Bakterien		
<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	Borreliose	Msch (selten Hd, Pfd)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Granulozytäre Anaplasiose	Msch, Hd, Pfd, Rd, Ktz
<i>Coxiella burnetii</i>	Q-Fieber	Msch, Wdk
<i>Rickettsia helvetica</i>	Pathogenität unklar	Msch
<i>Rickettsia monacensis</i>	Pathogenität unklar	Msch
<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylokokken Pyodermie	Lämmer
Protozoen		
<i>Babesia divergens</i>	Babesiose	Rd, (selten Msch)
<i>Babesia microti</i>	Pathogenität in EU unklar	Msch
<i>Babesia</i> sp. EU1	Pathogenität unklar	Msch

Abk.: Msch: Mensch; Hd: Hund; Pfd: Pferd; Rd: Rind; Ktz: Katze; Wdk: Wiederkäuer; EU: Europa

*nur empfängliche Wirte, welche klinische Symptome entwickeln können

Für die Epidemiologie dieser Krankheitserreger sind Faktoren wie Reservoirfunktion von Wirtstieren und Zecke, Zeckeninfestation, Wirtsspektrum und die Übertragungswege der Krankheitserreger innerhalb der Zecke von entscheidender Bedeutung (Parola und Raoult, 2001). Vier Übertragungswege können auftreten: transstadial (zwischen zwei aktiven Entwicklungsstadien), transovarial oder vertikal (von einer infizierten weiblichen Zecke auf die Eier), mittels Cofeeding (horizontale Übertragung bei simultaner Infestation) sowie die sexuelle Übertragung (durch infizierte Spermatophoren) (Eckert et al., 2008; Parola und Raoult, 2001). Nur wenige Krankheitserreger (z.B. einige Rickettsien) sind fähig alle vier Übertragungswege in der Zecke zu nutzen, um ihren Lebenszyklus aufrecht zu erhalten (Parola und Raoult, 2001; Socolovschi et al., 2009).

2.2 *Babesia* spp.

2.2.1 Taxonomie und Morphologie

Babesien wurden erstmalig 1888 von Victor Babes beschrieben und stellen obligat in Erythrozyten parasitierende Protozoen aus dem Stamm der Apicomplexa dar (Homer et al., 2000). Über 100 weltweit vorkommende Babesienarten sind bisher bekannt und werden innerhalb der Ordnung Piroplasmida in die Familie der Babesiidae eingeordnet (Homer et al., 2000; Süss et al., 2004). Charakteristisch für *Babesia* spp. sind die tropfen- oder birnenförmigen Merozoiten, die in den Wirtstiererythrozyten zentral oder marginal meist paarweise liegen (Eckert et al., 2008). Morphologisch lassen sie sich in große (Trophozoiten sind $> 2,5\mu\text{m}$) und kleine Babesien (Trophozoiten sind $< 2,5\mu\text{m}$) unterteilen, wobei die kleinen Babesien phylogenetisch den Theilerien näher verwandt scheinen (Allsopp und Allsopp, 2006). Die ursprüngliche Einteilung der Piroplasmen in die Familien der Babesiidae und der Theileriidae aufgrund entwicklungspezifischer Unterschiede (Babesien zeigen transovariale Transmission und Theilerien parasitieren auch in Lymphozyten) ist aufgrund neuerer molekularbiologischer Untersuchungen stark im Wandel (Kjemtrup und Conrad, 2006; Uilenberg, 2006). Criado-Fornelio et al. (2003b) erwägen eine Neueinteilung der Piroplasmen in fünf Gruppen: (i) *B. microti* Gruppe, (ii) *Theileria*-like Gruppe, (iii) *Theileria* Gruppe, (iv) *Babesia* spp. sensu stricto Gruppe und (v) Gruppe der Babesien von Ungulaten (mit Ausnahme von *B. divergens* und *B. capreoli*).

2.2.2 Entwicklungszyklus, Vektor, Reservoir und Verbreitung von *Babesia divergens*, *Babesia microti* und *Babesia* sp. EU1

Babesien benötigen für ihren Lebenszyklus sowohl einen invertebraten als auch einen vertebraten Wirt. Der invertebrate Wirt ist dabei immer eine Zecke der Familie Ixodidae (Homer et al., 2000). Manche Babesien, wie *B. bigemina* oder *Theileria equi* (syn. *B. equi*), sind befähigt mehr als nur eine Zeckengattung zu infizieren (Homer et al., 2000). Die für Deutschland medizinisch relevanten Babesien werden durch Zecken der Gattung *Ixodes* (*B. divergens* und *Babesia* sp. EU1 durch *I. ricinus*; *B. microti* durch *I. ricinus* und *I. trianguliceps*) und *Dermacentor* (*B. canis canis* durch *Dermacentor reticulatus*) übertragen (Hunfeld

et al., 2008; Uilenberg, 2006). Nachdem eine Zecke infiziertes Blut mit der Blutmahlzeit aufgenommen hat, bilden sich im Darm einkernige Gameten („Strahlenkörper“), die mittels Gamogonie (geschlechtlicher Vermehrung) zur Zygote fusionieren. Die Zygote dringt in das Darmepithel der Zecke ein und befällt über die Hämolymphe andere Organe, wie die Speicheldrüsen oder die Ovarien (Homer et al., 2000; Süß et al., 2004). Die durch Sporogonie (ungeschlechtliche Vermehrung) gebildeten Sporozoiten werden bei der nächsten Blutmahlzeit auf ein Wirbeltier übertragen und befallen dessen Erythrozyten. Mittels Merogonie (ungeschlechtliche Vermehrung) entwickeln sich diese über Trophozoiten zu Merozoiten, die nach der Zerstörung der Zellen wieder neue Erythrozyten befallen können (Homer et al., 2000). Eine Vielzahl an verschiedenen Säugetieren (besonders Nagetiere) sowie Vögel können dabei als vertebrater Wirt fungieren (Süß et al., 2004).

B. divergens wurde ursprünglich als sehr wirtsspezifische bovine Babesie angesehen; Teilsequenzen verschiedener Gene von *B. divergens* wurden jedoch auch schon in Reh- und Rotwild sowie einem natürlich infizierten Rentier nachgewiesen (Duh et al., 2005b; Langton et al., 2003; Tampieri et al., 2008; Zintl et al., 2003). Bei der jüngeren Spezies *Babesia* sp. EU1 wird das Reh (*C. capreolus*) als Reservoir diskutiert (Bonnet et al., 2007a; Duh et al., 2005b; Tampieri et al., 2008). Die Zecke spielt für Babesienarten mit transovarieller Transmission (dargestellt für *B. divergens* und *Babesia* sp. EU1) neben der Funktion als Vektor auch eine entscheidende Rolle als Reservoir in der Aufrechterhaltung des Lebenszyklus (Bonnet et al., 2007b; 2009). Habitate mit hoher Zeckendichte wiesen fokale hohe Prävalenzen von *Babesia* spp. auf und lassen einen potentiellen Zusammenhang vermuten (Blaschitz et al., 2008a; Foppa et al., 2002). *B. microti*, welche ausschließlich transstadial in der Zecke übertragen wird, scheint im Gegensatz dazu ihren Reservoir in Feldmäusen (*Microtus* spp.) und Waldspitzmäusen (*Sorex araneus*) zu haben (Bown et al., 2011; Karbowski, 2004). *Babesia* spp. wurde bisher in verschiedenen europäischen Ländern mit Prävalenzen zwischen 0,6 und 51,04% in *I. ricinus* nachgewiesen (Tab. 2). In Süddeutschland wurden Werte zwischen 1,0 und 1,3% ermittelt und in Mitteldeutschland Werte von 5,0 bis 10,7% (Franke et al., 2010a; Hartelt et al., 2004; Hildebrandt et al., 2010c; Leonhard, 2005; Pauliks, 2009).

Tabelle 2: Vorkommen von *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* in Europa (nur Zecken von Vegetation)

Land	Ermittelte Spezies	Prävalenz	Referenzen
Deutschland	<i>B. div.</i> , <i>B. mic.</i>	1-10,7%	(Franke et al., 2010a; Hartelt et al., 2004; Hildebrandt et al., 2010c; Pauliks, 2009)
Estland	<i>B. sp. EU1</i> , <i>B. mic.</i>	1,6%	(Katargina et al., 2011b)
Frankreich	<i>Babesia</i> spp.	6,1-20,6% ¹	(Cotté et al., 2010; Halos et al., 2005)
Italien	<i>B. sp. EU1</i> , <i>Babesia</i> spp.	0,85-1,6%*	(Cassini et al., 2010; Piccolin et al., 2006)
Litauen	<i>B. div.</i>	2%	(Radzijeuskaja et al., 2008)
Luxemburg	<i>B. sp. EU1</i> , <i>B. mic.</i> , <i>B. div.</i>	2,7%	(Reye et al., 2010)
Niederlande	<i>B. sp. EU1</i> , <i>B. div.</i> , <i>B. mic.</i>	0,6-2,3%	(Wielinga et al., 2008)
Norwegen	<i>B. div.</i>	0,9%	(Radzijeuskaja et al., 2008)
Österreich	<i>B. div.</i> , <i>B. div.</i> -like, <i>Babesia</i> spp.	51,04%	(Blaschitz et al., 2008a)
Polen	<i>B. mic.</i> , <i>B. div.</i>	0,6-16,3%	(Kuźna-Grygiel et al., 2002; Pieniążek et al., 2006; Siński et al., 2006; Skotarczak und Cichočka, 2001; 2003; Stańczak et al., 2004; Wójcik-Fatla et al., 2009)
Schweiz	<i>B. mic.</i> , <i>B. sp. EU1</i>	0,7-4%*	(Casati et al., 2006; Foppa et al., 2002; Gigandet et al., 2011)
Slowenien	<i>B. mic.</i> , <i>B. div.</i> , <i>B. sp. EU1</i>	9,6%	(Duh et al., 2001, 2005a)

B. div.: *B. divergens*; *B. mic.*: *B. microti*; *B. sp. EU1*: *Babesia* sp. EU1

Bei Prävalenzen gekennzeichnet mit ¹ sind untersuchte Stichproben mit n < 100 enthalten.

Bei Prävalenzen gekennzeichnet mit * sind Untersuchungen mit Zeckenpools enthalten.

2.2.3 Klinik von *Babesia divergens*, *Babesia microti* und *Babesia* sp. EU1

Für die klinische Manifestation der Babesiose ist die ungeschlechtliche Vermehrung des Pathogens in den Erythrozyten der Wirtstiere und die damit verbundene Hämolyse verantwortlich (Homer et al., 2000). Dementsprechend sind die Symptome vielfältig und eher unspezifisch. Aufgrund der intravaskulären Hämolyse kommt es zu hohem Fieber, Unwohlsein, Schüttelfrost, Muskelschmerzen, Anämie, Ermüdungserscheinungen, Übelkeit, Erbrechen und

Durchfall (Gray et al., 2010). Die Inkubationszeit kann dabei 5 Tage bis 9 Wochen betragen (Süss et al., 2004).

Der erste klinische Fall einer humanen Babesiose wurde 1957 im ehemaligen Jugoslawien bei einem splenektomierten Rinderzüchter dokumentiert (Referenz zitiert in Süss et al., 2004). Seitdem traten in den USA mehrere hundert, in Europa ca. 40 klinische Fälle auf (Vannier und Krause, 2009). In den USA stellt *B. microti* den Haupterreger der humanen Babesiose dar, jedoch konnten auch schon klinische Fälle durch *B. duncati* n. sp. und *B. divergens*-like beobachtet werden (Conrad et al., 2006; Herwaldt et al., 1996; Homer et al., 2000). Im Gegensatz dazu ist der Haupterreger der humanen Babesiose in Europa *B. divergens* und es sind nur vereinzelte Fälle durch *B. microti* und *Babesia* sp. EU1 dokumentiert (Herwaldt et al., 2003; Hildebrandt et al., 2008). Des Weiteren ist zu erwähnen, dass sich geographische Varianten von *B. microti* zwischen den USA und Europa sowohl hinsichtlich ihrer morphologischen Erscheinung sowie bezüglich Pathogenität und Transmissionsverhalten im Vektor unterscheiden können (Gray et al., 2002). Der Erreger *B. divergens* wurde zudem in den USA noch nicht nachgewiesen (Holman, 2006). Neben dem Erregerspektrum der humanen Babesiose scheint auch die Pathogenität geographisch zu variieren; in Europa erkranken fast ausschließlich splenektomisierte oder anderweitig immunsupprimierte Patienten, wohingegen in den USA auch Patienten mit intaktem Immunsystem erkranken (Zintl et al., 2003). Der Schweregrad der humanen Babesiose kann von mild bis letal verlaufen (Süss et al., 2004). Erkrankungen ausgelöst durch *B. microti* stellen sich in der Regel weniger akut dar als klinische Fälle, welche auf *B. divergens* zurück zu führen sind, und Infektionen mit *Babesia* sp. EU1 scheinen sich generell milder zu gestalten (Hunfeld et al., 2008; Kjemtrup und Conrad, 2000).

Der Erregernachweis kann durch direkte (Giemsa gefärbter Blutastrich und PCR) und indirekte Methoden (z.B. Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT)) erfolgen. Auch die Inokulation des Erregers in Versuchstiere oder *in vitro* Kultivierung können zu diagnostischen Zwecken verwendet werden, sind aber in der Praxis eher nicht praktikabel (Hunfeld et al., 2008).

In der Veterinärmedizin ist die Babesiose schon seit dem 19. Jahrhundert eine bekannte Erkrankung (Gray, 2006). Aufgrund der Vielzahl vorkommender Arten,

die bei domestizierten Tieren (z.B. Rind, kleine Wiederkäuer, Pferd, Hund, Schwein) weltweit eine Babesiose verursachen können, wird an dieser Stelle nur *B. divergens* näher betrachtet, welche in Europa den wirtschaftlich bedeutenden Erreger des „Weide- oder Mairotes“ beim Rind darstellt (Uilenberg, 2006). Diese Erkrankung ist in Großbritannien, Irland, Skandinavien, in den Niederlanden, Österreich, Schweiz und Deutschland weit verbreitet (Rommel et al., 2000). Die Inzidenz der bovinen Babesiose durch *B. divergens* ist aufgrund einer Vielzahl subklinischer Infektionen noch ungewiss. Der Schweregrad der Erkrankung ist stark abhängig sowohl vom Immunstatus des Tieres, der Menge an infestierten Zecken sowie der Virulenz des Pathogens (Zintl et al., 2003). Erkrankungen bei Weidetieren werden im Mai/Juni und im September/Okttober zur Zeit der höchsten Zeckenaktivität beobachtet. Dabei können Kälber bis zu 9 Monaten eine infektionsgebundene Immunität bei Kontakt mit dem Erreger entwickeln. Es kommt in diesem Alter zu keiner klinischen Infektion (Zintl et al., 2003). Dies lässt sich sowohl durch die passive Immunisierung durch das Muttertier als auch durch eine antikörperunabhängige Jungtierresistenz erklären (Rommel et al., 2000). Kommen ältere Tiere erstmalig mit dem Krankheitserreger in Kontakt können hochgradige Störungen des Allgemeinbefindens mit Fieber, Anämie, Ikterus, Hämoglobinurie, Pansenparese und Durchfall beobachtet werden (Rommel et al., 2000). Nach überstandener klinischer Erkrankung bilden Tiere eine lang andauernde Prämunität aus und können jahrelang eine Ansteckungsquelle für Zecken darstellen (Rommel et al., 2000).

2.3 *Anaplasma phagocytophilum*

2.3.1 Taxonomie und Morphologie

A. phagocytophilum ist ein obligat intrazelluläres α -Proteobakterium aus der Ordnung der Rickettsiales (Familie: Anaplasmataceae). Es ist ein gram-negativer, 0,5-1,5 μ m großer, kokkoider bis pleomorpher Organismus, welcher in Granulozyten von Säugetieren auftritt. Die Bakterien befinden sich dabei in Form von Makrokolonien (Morulae) in Vakuolen im Zytoplasma infizierter eukaryotischer Wirtszellen und werden durch eine innere und eine äußere Membran abgegrenzt (Rikihisa, 1991; Woldehiwet, 2010). Ursprünglich als eigenständige Erreger innerhalb der *Ehrlichia* (*E.*) *phagocytophilum* Gruppe

betrachtet, wurden *E. equi*, *E. phagocytophilum* und der Erreger der Humanen Granulozytären Ehrlichiose aufgrund von Ähnlichkeiten ihrer 16S rRNA Nucleotidsequenz zu der Spezies *A. phagocytophilum* reklassifiziert (Dumler et al., 2001; Rikihisa, 1991). Diese Klassifizierung wurde jedoch von Uilenberg et al. (2004) stark kritisiert, da Teilnukleotidsequenzen, die zu phylogenetischen Einordnungen verwendet werden, den phänotypischen Charakteristika der einzelnen Spezies nicht immer Rechnung tragen können. Molekularbiologische Untersuchungen verschiedener Gene (*msp4*, *p44/msp2*, *ankA*, *groEL* und 16S rRNA) sprechen für eine Heterogenität dieses Bakteriums. Genetische Varianten von *A. phagocytophilum* zeigten neben geographischen Unterschieden auch unterschiedliche Vektor- und Wirtstropismen sowie Unterschiede in ihrer Pathogenität (Alberti et al., 2005; de la Fuente et al., 2005; Milutinović et al., 2008; Rymaszewska, 2008; Scharf et al., 2011; Silaghi et al., 2011a; Stuen et al., 2003).

2.3.2 Entwicklungszyklus, Vektor, Reservoir und Verbreitung

Der Entwicklungszyklus von *A. phagocytophilum* ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch unzureichend erforscht und verstanden (Parola et al., 2005a). Es ist bekannt, dass es 4-7 Tage nach dem Stich einer mit *A. phagocytophilum* infizierten Zecke zu einer Bakteriämie kommen kann (Woldehiwet, 2010). Welche Zellen während der Inkubationszeit für die Vermehrung der zellgebundenen Bakterien nach der Übertragung durch die Zecke eine Rolle spielen, ist aktuell noch ungewiss. Eine Beteiligung von Lungen- und Milzzellen, myeloider Vorläuferzellen im Knochenmark oder mikrovaskulärer Endothelzellen wird vermutet (Munderloh et al., 2004; Walker und Dumler, 1996; Woldehiwet, 2010). Neutrophile und eosinophile Granulozyten, sowie Monozyten, welche durch die Elementarkörperchen infiziert werden, stellen die Zielzellen für *A. phagocytophilum* im Wirt dar (Woldehiwet, 2010). Die Vermehrung in diesen Zellen geschieht durch Zweiteilung (Süss et al., 2004).

Übertragen wird *A. phagocytophilum* in Europa hauptsächlich durch *I. ricinus*. In Großbritannien wird daneben auch ein Nischenzyklus mit *I. trianguliceps* diskutiert (Bown et al., 2003). Durch die weite Verbreitung des Vektors wurde *A. phagocytophilum* schon in vielen europäischen Ländern nachgewiesen (Tab. 3). In

Deutschland liegen ermittelte Infektionsraten zwischen 1,0 und 5,4% (Hartelt et al., 2004; Hildebrandt et al., 2010b).

In *I. ricinus* tritt eine transtadiale Übertragung von *A. phagocytophilum* zwischen den aktiven Entwicklungsstadien auf. Eine transovarielle Transmission konnte nicht oder nur unzureichend nachgewiesen werden (Ogden et al., 1998). Ein kompetentes Reservoiertier ist demzufolge obligat notwendig. Es wird davon ausgegangen, dass das Reh (*C. capreolus*) das Hauptreservoir für *A. phagocytophilum* darstellt (Alberdi et al., 2000). Jedoch konnte dieses Bakterium u.a. auch schon in Rotwild (*Cervus elaphus*), Gämsen (*Rupicapra rupicapra*), Steinbock (*Capra ibex*), Mufflon (*Ovis orientalis musimon*), Wildschweinen (*Sus scrofa*), Füchsen (*Vulpes vulpes*), Igel (*Erinaceus europaeus*) und Kleinsäugetern nachgewiesen werden (Hulínská et al., 2004; Liz et al., 2000; Petrovec et al., 2003; Silaghi et al., 2011a; Skuballa et al., 2010; Stefanidesova et al., 2008). Die Rolle von Vögeln ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt, man geht jedoch davon aus, dass sie in der Verbreitung des Erregers eine Rolle spielen können (Alekseev et al., 2001; Bjöersdorff et al., 2001; Franke et al., 2010b). Auch die Bedeutung von Reptilien im Lebenszyklus von *A. phagocytophilum* ist aktuell noch unklar. Es wird ein Verdünnungseffekt durch *A. phagocytophilum* z.B. auf die Anwesenheit von Borrelien in *I. ricinus* diskutiert (Václav et al., 2010).

2.3.3 Klinik

In den USA ist die humane Granulozytäre Anaplasiose (HGA) nach der Borreliose die zweitbedeutendste zeckenübertragene Krankheit mit steigender Inzidenz seit dem ersten bestätigten klinischen Fall 1994 (auch durch gesteigertes Bewusstsein der Ärzte) (Chen et al., 1994; Dumler et al., 2005). Im Jahre 2008 wurden den Centers for Disease Control and Prevention (CDC) schon über 1.000 Krankheitsfälle in den USA gemeldet (<http://www.cdc.gov/anaplasmosis>). Dabei treten Erkrankungen gehäuft im Frühling und Sommer auf (Parola et al., 2005a). Im Gegensatz dazu sind in Europa seit dem ersten klinischen Fall 1997 in Slowenien bisher ca. 70 klinische Fälle einer HGA dokumentiert (Doudier et al., 2010; Petrovec et al., 1997).

Tabelle 3: Vorkommen von *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* in Europa (nur Zecken von Vegetation)

Land	Prävalenz	Referenzen
Bulgarien	19,8%*	(Christova et al., 2001)
Dänemark	23,6%*	(Skarphéðinsson et al., 2007)
Deutschland	1-5,4%	(Fingerle et al., 1999; Hartelt et al., 2004; Hildebrandt et al., 2002; 2010b; Leonhard, 2005; Oehme et al., 2002; Pichon et al., 2006; Silaghi et al., 2008a; von Loewenich et al., 2003a)
Estland	1,7%	(Katargina et al., 2011a)
Frankreich	0,3-15%*	(Cotté et al., 2010; Halos et al., 2006; 2010)
Großbritannien	7% ¹	(Guy et al., 1998)
Italien	4,4-24,4% ¹	(Cinco et al., 1997; Mantelli et al., 2006; Piccolin et al., 2006)
Litauen	3%	(Radzijeuskaja et al., 2008)
Luxemburg	1,9%	(Reye et al., 2010)
Moldawien	5,1-9%	(Koči et al., 2007; Movila et al., 2009)
Norwegen	4,5-5,7%	(Radzijeuskaja et al., 2008; Rosef et al., 2009)
Österreich	5,1-6,6%	(Polin et al., 2004; Sixl et al., 2003)
Polen	4,5-19,2%	(Grzeszczuk et al., 2002; Grzeszczuk und Stańczak, 2006a; Skotarczak et al., 2003; Stańczak et al., 2002; Stańczak et al., 2004; Tomasiewicz et al., 2004; Wójcik-Fatla et al., 2009)
Portugal	0,3-4%	(de Carvalho et al., 2008; Santos et al., 2004)
Russland	13,4%	(Katargina et al., 2011a)
Schweden	1,3-15%*	(Severinsson et al., 2010; von Stedingk et al., 1997)
Schweiz	1,2-2%*	(Leutenegger et al., 1999; Liz et al., 2000; Pusterla et al., 1999; Wicki et al., 2000)
Serbien	13,9%	(Milutinović et al., 2008)
Slowakei	4,4-13,3% ¹	(Derdáková et al., 2003; Smetanová et al., 2006)
Slowenien	3,2% ¹	(Petrovec et al., 1999)
Türkei	2,7-17,5%	(Sen et al., 2011)
Ukraine	3,6% ¹	(Movila et al., 2009)
Weißrussland	4,2%	(Katargina et al., 2011a)

Bei Prävalenzen gekennzeichnet mit ¹ sind untersuchte Stichproben mit n < 100 enthalten.
 Bei Prävalenzen gekennzeichnet mit * sind Untersuchungen mit Zeckenpools enthalten.

Für Deutschland sind bisher keine Fälle publiziert, obwohl im angrenzenden Tirol in Österreich in den letzten Jahren fünf klinische Fälle einer HGA beobachtet wurden (Walder et al., 2006) und Seroprävalenzen in Deutschland mit Werten bis zu 16% in Risikogruppen nachweisbar sind (Fingerle et al., 1997; Oehme et al., 2002). Der Schweregrad dieser Erkrankung beim Menschen kann sich von milden und selbst limitierenden Infektionen bis zu fulminanten Erkrankungen mit Todesfolge darstellen (Dumler et al., 2007). Nach einer Inkubationszeit von 7-10 Tagen treten Symptome wie Fieber, Appetitlosigkeit, Unwohlsein und Antriebslosigkeit auf. Laborparameter ergeben typischerweise eine Thrombozytopenie und eine Leukopenie, teils auch eine Anämie (Dumler et al., 2005; Parola et al., 2005a). Schwere Krankheitsverläufe können durch die Beteiligung von Sekundärinfektion (z.B. durch Staphylokokken) oder Grunderkrankungen anderer Genese (z.B. Diabetes mellitus) auftreten (Bakken und Dumler, 2000; Woldehiwet, 2010).

A. phagocytophilum kann während der akuten Fieberphase direkt im Giemsa-gefärbten Blutaussstrich durch Nachweis der Morulae im Zytoplasma der Granulozyten diagnostiziert werden. Der serologische Nachweis mittels eines IFAT stellt die gebräuchlichste diagnostische Methode dar, jedoch bietet der direkte Erregernachweis mittels PCR mit Identifikation und genetischer Differenzierung des Erregers die sensitivste Möglichkeit in der ersten Erkrankungswoche eine Diagnose zu stellen (Blanco und Oteo, 2002; Dumler et al., 2007). Eine *in vitro* Kultivierung von *A. phagocytophilum* kann zu diagnostischen Zwecken durchgeführt werden. Dies ist jedoch nur in speziellen Laboreinrichtungen möglich und kann 2-3 Wochen dauern, bis ein positives Ergebnis vorliegt (Dumler et al., 2007).

Veterinärmedizinisch ist *A. phagocytophilum* schon seit 70 Jahren bekannt und kann neben Weidefieber beim Wiederkäuer auch die Granulozytäre Anaplasmosis beim Pferd, beim Hund und selten bei der Katze verursachen (Bermann et al., 2002; Kohn et al., 2008; Pfister et al., 1987; Schaarschmidt-Kiener et al., 2009; Woldehiwet, 2006). Verbreitet sind diese Erkrankungen in ganz Europa sowie in den USA (mit Ausnahme des Weidefiebers) (Woldehiwet, 2010). In Wiederkäuern kann *A. phagocytophilum* eine fieberhafte Erkrankung mit reduzierter Milchleistung, Aborten und einer generellen Immunsuppression

verursachen, welche Sekundärinfektionen begünstigt (Guyot et al., 2011; Matsumoto et al., 2006; Woldehiwet, 2006). Eine über Monate anhaltende Persistenz des Erregers ist möglich (Stuen, 2007). Die Equine Granulocytäre Anaplasrose ist seit 1984 in Europa bekannt und es kommt zu Ödemen der Extremitäten, petechialen Blutungen, Ikterus und Gangataxie (Bermann et al., 2002; Butler et al., 2008; Scarpulla et al., 2003). Auch in Deutschland wurden klinische Fälle einer Equinen Granulozytären Anaplasrose publiziert (Silaghi et al., 2011c; Von Loewenich et al., 2003b). Bei Hunden macht sich eine Canine Granulocytäre Anaplasrose meist mit Fieber, Gewichtsverlust, Apathie und Splenomegalie bemerkbar. Auch Lahmheit und Durchfall können auftreten (Kohn et al., 2008; Pusterla et al., 1997). In Deutschland finden sich neben klinisch manifesten Fällen einer Caninen Granulocytären Anaplasrose auch hohe Seroprävalenzen von bis zu 50% (Barutzki et al., 2006; Jensen et al., 2007; Kohn et al., 2008; 2010). Infektionen bei der Katze sind eher selten und zeigen unspezifische Symptome (Heikkilä et al., 2010; Schaarschmidt-Kiener et al., 2009).

2.4 *Rickettsia* spp. (Zeckenbissfieber-Gruppe)

2.4.1 Taxonomie und Morphologie

Rickettsien gehören zu den obligat intrazellulären α -Proteobakterien aus der Ordnung der Rickettsiales (Familie: Rickettsiaceae). Sie wurden ursprünglich in drei Gruppen eingeteilt: die Zeckenbissfieber-Gruppe (engl. spotted fever group, SFG), die Typhus-Gruppe und die Tsutsugamushi-Fieber-Gruppe (engl. scrub typhus group, STG). Untersuchungen der letzten Jahre auf molekularer Ebene ergaben, dass diese Einteilung nicht widerspruchsfrei ist (Fournier und Raoult, 2009). Die aktuelle Klassifizierung unterscheidet zwischen der großen Gruppe der Zeckenbissfieber-Rickettsien, der Gruppe der Epidemischen-Fleckfieber-Rickettsien mit den zwei Spezies *R. prowazekii* und *R. typhi* und der Gruppe der Ahnen-Rickettsien (*R. canadensis* und *R. bellii*) (Dobler und Wölfel, 2009; Fournier und Raoult, 2009). Die STG Rickettsien wurden zur neuen Gattung *Orientia* umbenannt (Tamura et al., 1995). Es sind gegenwärtig mehr als 25 Rickettsienarten bekannt sowie eine Reihe von *Rickettsia*-like Spezies (Fournier und Raoult, 2009).

Alle Rickettsien sind kleine (ca. 0,3 x 1,0µm), teils kokkoide gram-negative Stäbchen, die sich im Zytoplasma eukaryotischer Zellen vermehren. Sie lassen sich schlecht in der Gram-Färbung darstellen, jedoch gut mit Giemsa oder Gimenez (Süss et al., 2004).

2.4.2 Entwicklungszyklus, Vektor, Reservoir und Verbreitung

Rickettsia spp. werden durch hämatophage Arthropoden (Zecken, Flöhe, Läuse und Milben) übertragen (Dobler und Wölfel, 2009). Bei der Zecke kommt es nach der Invasion des Bakteriums in die Darmzellen zu einer generalisierten Infektion des Hämozoel (Socolovschi et al., 2009). Der bakterielle Organismus kann danach im Speichel, in den Fäzes und der Coxal-Flüssigkeit gefunden werden. Die Übertragung auf den Wirt erfolgt durch Stich, Biss oder Inokulation erregerhaltiger Fäzes (Süss et al., 2004). Das Bakterium wird darauffolgend durch eine induzierte Phagozytose in die Wirtszelle aufgenommen und befindet sich dabei frei im Zytoplasma oder im Zellkern (Zeckenbissfiebergruppe). Die Vermehrung geschieht durch Querteilung (Süss et al., 2004). Die Zielzellen von *Rickettsia* spp. stellen v.a. Endothelzellen kleinerer und mittlerer Blutgefäße dar (Parola et al., 2005b).

In Deutschland wurden bis dato sechs verschiedene Rickettsien Arten (*R. helvetica*, *R. monacensis*, *R. massiliae*, *R. slovacica*, *R. raoultii* und *R. felis*) in Zecken nachgewiesen, welche alle humanpathogenes Potential besitzen (Burgdorfer et al., 1979; Dobler et al., 2009; Dobler und Wölfel, 2009; Richter et al., 2002; Silaghi et al., 2011b; Simser et al., 2002). *I. ricinus* stellt dabei den Vektor für *R. helvetica* und *R. monacensis* dar sowie *Dermacentor* (*D.*) spp. für *R. slovacica* (*D. marginatus*) und *R. raoultii* (*D. marginatus* und *D. reticulatus*) (Socolovschi et al., 2009). *R. felis* scheint mit dem Katzenfloh (*Ctenocephalides felis*) assoziiert zu sein, wurde aber in Deutschland auch schon in *I. ricinus* nachgewiesen (Bouyer et al., 2001; Dobler und Wölfel, 2009). Infektionsraten von *Rickettsia* spp. in *I. ricinus* können innerhalb Europas stark variieren (Tab. 4).

Die Rolle von Säugetieren als Reservoir für *Rickettsia* spp. ist momentan noch ungewiss (Parola und Raoult, 2001). Der Einfluss von Vögeln und Reptilien auf den Vermehrungszyklus von Rickettsien ist dabei ebenfalls noch unklar, man geht jedoch davon aus, dass Vögel wie bei *A. phagocytophilum* und *Babesia* spp. eine

Rolle bei der Verbreitung des Erregers einnehmen können (Franke et al., 2010b; Hildebrandt et al., 2010a; Movila et al., 2011; Tjisse et al., 2010; Václav et al., 2010). Neben der Funktion als Vektor stellen Zecken auch ein Reservoir für die Aufrechterhaltung des Vermehrungszyklus dar. So besitzen manche Rickettsien die Fähigkeit zu transstadialer, transovarialer und sexueller Übertragung in der Zecke sowie zur Übertragung mittels Cofeeding (Socolovschi et al., 2009).

2.4.3 Klinik

Ein klassisches, pathologisches Merkmal einer zeckenübertragenen Rickettsiose ist eine Vaskulitis (Süss et al., 2004). Nach einer Inkubationszeit von ca. sechs Tagen finden sich bei einer Zeckenbissfieber-Rickettsiose typische Symptome wie Fieber, Kopf- und Muskelschmerzen, Hautausschlag, lokaler Lymphadenopathie und der charakteristische Eschar („tache noir“) (Parola et al., 2005a). Die klinische Erscheinung variiert abhängig vom infizierenden Erreger und milde bis fatale Verlaufsformen dieser Erkrankung können beobachtet werden (Parola et al., 2005a). Rickettsiosen treten weltweit auf und stellen die zweithäufigste reisebedingte Erkrankung nach der Malaria in Europa dar (Dobler und Wölfel, 2009). Auch sind manche dieser Erkrankungen schon seit vielen Epochen bekannt; so stellt z. B. schon das Epidemische Rückfallfieber (*R. prowazekii*) bei Feldzügen von Wallenstein, Napoleon oder Kaiser Wilhelm I. den kriegsentscheidenden Faktor dar (Süss et al., 2004). Daneben haben auch das in Europa endemisch vorkommende Mediterrane Fleckfieber (*R. conorii*) und die Krankheitskomplexe TIBOLA (engl. Tick-borne Lymphadenopathie) und DEBONEL (engl. *Dermacentor*-borne-necrosis-erythema-lympadenopathie) durch *R. slovaca* regional in Europa klinische Bedeutung (Parola, 2004). Das humanpathogene Potential von *R. helvetica* und *R. monacensis* ist zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt (Parola, 2004). *R. helvetica* wurde 1999 mit zwei klinischen Fällen einer fatal verlaufenden Perimyokarditis in Verbindung gebracht sowie mit Meningitis und mehreren klinischen Fällen von unspezifischen milden Symptomen (Fieber, Kopf- und Muskelschmerzen) (Ciceroni et al., 2006; Fournier et al., 2004; Nilsson et al., 1999b; 2010). Des Weiteren wurden zwei Fälle einer akuten Rickettsiose in Spanien auf eine Infektion mit *R. monacensis* zurückzuführen (Jado et al., 2007).

Tabelle 4: Vorkommen von *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* in Europa (nur Zecken von Vegetation)

Land	Ermittelte Spezies	Prävalenz	Referenzen
Dänemark	<i>R. helv.</i>	4,7%	(Kantsø et al., 2010)
Deutschland	<i>R. helv.</i> , <i>R. mona.</i> , <i>R. mass.</i> , <i>R. felis</i> ²	4,1-14,7%*	(Dobler und Wölfel, 2009; Franke et al., 2010a; Hartelt et al., 2004; Hildebrandt et al., 2010b; Pichon et al., 2006; Silaghi et al., 2008b; Silaghi et al., 2011b; Wölfel et al., 2006)
Frankreich	<i>R. helv.</i> , <i>Rickettsia</i> spp.	1,4-16% ¹	(Cotté et al., 2010; Halos et al., 2006; 2010; Parola et al., 1998)
Italien	<i>R. helv.</i> , <i>R. mona.</i> , <i>Rickettsia</i> spp.	1,6-38,5%	(Beninati et al., 2002; Bertolotti et al., 2006; Piccolin et al., 2006)
Luxemburg	<i>R. helv.</i> , <i>R. mona.</i>	5,1%	(Reye et al., 2010)
Moldawien	<i>R. mona.</i> , <i>R. helv.</i>	17,3%	(Movila et al., 2009)
Niederlande	<i>R. helv.</i>	6-66%	(Sprong et al., 2009)
Österreich	<i>R. helv.</i> , <i>Rickettsia</i> spp.	4,8-35,6%	(Blaschitz et al., 2008b; Řeháček et al., 1997)
Polen	<i>R. helv.</i>	2,9-12,7%*	(Stańczak, 2006; Stańczak et al., 2008)
Portugal	<i>R. mona.</i> , <i>Rickettsia</i> spp.	20%	(de Carvalho et al., 2008)
Ukraine	<i>R. mona.</i> , <i>R. helv.</i>	6% ¹	(Movila et al., 2009)
Schweden	<i>R. helv.</i>	1,5-36,8%*	(Nilsson et al., 1997; 1999a; Severinsson et al., 2010)
Schweiz	<i>R. helv.</i> , <i>R. mona.</i>	8,4-11,7%*	(Boretti et al., 2009; Burgdorfer et al.,
Slowenien	<i>R. helv.</i> , <i>Rickettsia</i> spp.	4,6%	(Prosenc et al., 2003)
Slowakei	<i>Rickettsia</i> spp.	6,3%	(Smetanová et al., 2006)

R. helv.: *Rickettsia helvetica*; *R. mona.*: *Rickettsia monacensis*; ² Nachweis von *R. felis*, aber keine Prävalenzermittlung.
Bei Prävalenzen gekennzeichnet mit ¹ sind untersuchte Stichproben mit n < 100 enthalten.
Bei Prävalenzen gekennzeichnet mit * sind Untersuchungen mit Zeckenpools enthalten.

Zur Diagnosestellung einer Rickettsiose ist die PCR als sensitivste Methode aktuell Mittel der Wahl. Serologische Tests (IFAT) scheinen ab der zweiten Erkrankungswoche erfolgsversprechend, jedoch ist aufgrund der starken Kreuzreaktivität der einzelnen Spezies eine Speziesdifferenzierung über ein Westernblot-Verfahren notwendig. Auch eine *in vitro* Kultivierung von Rickettsien ist möglich, jedoch stellt dieses Verfahren eine schwierige und langwierige Methode dar (Dobler und Wölfel, 2009).

2.5 *Bartonella* spp.

2.5.1 Taxonomie und Morphologie

Bartonellen sind pleomorphe, leicht gebogene, fakultativ intrazelluläre, gram-negative Stäbchenbakterien (α -Proteobakterien) aus der Familie der Bartonellaceae. Sie sind phylogenetisch den Gattungen *Brucella*, *Agrobacterium* und *Rhizobium* nah verwandt (Birtles, 2005). Ursprünglich in der Ordnung der Rickettsiales eingeordnet wurden aufgrund molekularbiologischer Untersuchungen des *16S rRNA* Gens die Gattung *Rochalimeae* (mit *Rochalimeae quintana*, *Rochalimeae vinsonii*, *Rochalimeae henselae* und *Rochalimeae elisabethae*) in die Gattung der *Bartonella* integriert sowie die Familie der Bartonellaceae aus der Ordnung der Rickettsiales entfernt (Brenner et al., 1993). Aktuell sind 24 verschiedene Arten von *Bartonella* spp. beschrieben, wovon 13 Spezies eine humanpathogene Relevanz besitzen (Vayssier-Taussat et al., 2009).

2.5.2 Entwicklungszyklus, Vektor, Reservoir und Verbreitung von *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus*

Reservoirtiere für *Bartonella* spp. sind verschiedene Säugetiere (häufig Carnivore und Nagetiere) sowie auch der Mensch (für *B. bacilliformis* und *B. quintana*) (Birtles, 2005). Bartonellen zeigen sich stark wirtsspezifisch (Chomel et al., 2009). Die Übertragung kann mittels eines Vektors geschehen (Flöhe, Läuse, Sandfliegen, auch Zecken oder hämatophage Fliegen werden diskutiert), ist jedoch auch über Bluttransfusion möglich (Billeter et al., 2008; Chung et al., 2004; Magalhães et al., 2008; Sanogo et al., 2003). *Bartonella* spp. kann eine anhaltende Infektion des Verdauungstrakts der Arthropoden bedingen (Chomel et al., 2009). Der Erreger wird mit den infizierten Fäzes ausgeschieden und infiziert

den Wirt über Irritationen und Verletzungen der Haut (Birtles, 2005). Nach dem Eindringen der Erreger vermehren sich Bartonellen für vier Tage in noch ungeklärten Zielzellen (vermutet werden Zellen des retikuloendothelialen Systems), bevor sie in den Blutstrom gelangen und neben Erythrozyten auch Endothelzellen befallen (Chomel et al., 2009; Schüle et al., 2001). Dabei kann beobachtet werden, dass in speziesspezifischen Wirten meist eine Infektion der Erythrozyten stattfindet, wohingegen es bei Fehlwirten (z. B. der Mensch bei *B. henselae*) auch zu einer Invasion der Endothelzellen kommt, welche zu angioproliferativen Reaktionen führen kann (Chomel et al., 2009).

Tabelle 5: Vorkommen von *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Europa (nur Zecken von Vegetation)

Land	Ermittelte Spezies	Prävalenz	Referenzen
Frankreich	<i>B. schoenbuschensis</i> -like, <i>Bartonella</i> spp.	0,2-9,8% ¹	(Cotté et al., 2010; Halos et al., 2005)
Luxemburg	<i>B. henselae</i>	0,3%	(Reye et al., 2010)
Tschech. Rep.	<i>Bartonella</i> spp.	1,2%	(Hercík et al., 2007)

Tschech. Rep.: Tschechische Republik

Bei Prävalenzen gekennzeichnet mit ¹ sind untersuchte Stichproben mit n < 100 enthalten.

Neben den bekannten Vektoren (Flöhe, Läuse und Stechmücken) konnte *Bartonella* spp. auch in verschiedenen Zeckenarten nachgewiesen werden (Angelakis et al., 2010). Experimentell konnte sowohl eine Übertragung von *B. henselae* von infizierten Katzen auf *I. ricinus* und vice versa sowie die transstadiale und transovarielle Transmission in der Zecke dargestellt werden (Cotté et al., 2008). Die Vektorkompetenz von *I. ricinus* wird jedoch aktuell noch diskutiert (Telford und Wormser, 2010). Berichte über *Bartonella* spp. in *I. ricinus*, die direkt von der Vegetation gesammelt wurden, sind selten und für Deutschland liegen aktuell noch keine Untersuchungsergebnisse vor (Tab. 5). Daneben wurden *B. henselae* bzw. *B. capreoli* und *Bartonella* spp. in *I. ricinus* nachgewiesen, welche von Menschen, Hunden und Rehen abgesammelt wurden (Prävalenzen zwischen 1,5 und 60%) (Podsiadly et al., 2007; Sanogo et al., 2003; Schouls et al., 1999; Skotarczak und Adamska, 2005).

2.5.3 Klinik von *Bartonella henselae*

Die klinische Erscheinungsform einer Bartonellose hängt stark vom Immunstatus des Patienten ab (Jacomino et al., 2002). Es kommt meist nur bei einem Fehlwirt oder bei der Infektion eines immunsupprimierten Wirtes zu einer klinischen Erkrankung (Birtles, 2005). Wirte können über einen langen Zeitraum infiziert sein ohne klinische Symptome zu zeigen sowie als klinisch gesunde Träger fungieren. Dies stellt eine Überlebensstrategie der Bartonellen mit Hinblick auf die Erregerübertragung durch Arthropoden dar (Chomel et al., 2009).

Die Bartonellose ist eine beim Menschen schon lang bekannte Erkrankung. Die durch *B. bacilliformis* ausgelöste Krankheit (Carrion Krankheit mit Oroya Fieber und Verruga peruana) trat schon zu Zeiten der Inkas auf (Kempf und Krämer, 2008). Auch das Schützengrabenfieber durch *B. quintana* (engl. Trench Fever) war während der Weltkriege weit verbreitet aufgrund der Übertragung durch Läuse. Heutzutage ist besonders die Katzenkratzkrankheit durch *B. henselae* (auch *B. clarridgeiae*) humanmedizinisch von Bedeutung. Diese Erkrankung tritt häufig bei Kindern auf, die durch Kratzer oder Bisse von Katzen infiziert werden. Das typische Bild ist eine einseitige Lymphadenitis 2-3 Wochen nach der Infektion, auch mit Fieber, Kopfschmerzen und Splenomegalie (Comer et al., 2001). Die Infektion ist in der Regel selbstlimitierend. Bei immunsupprimierten Patienten (v.a. AIDS-Patienten) kann es aufgrund der angioproliferativen Reaktionen zu den Krankheitsbildern der Bazillären Angiomatose (kutane Manifestation) oder Peliosis Hepatis (hepatische Manifestation) kommen (Comer et al., 2001). Bei Patienten mit Herzklappenerkrankungen konnte eine Infektion mit Bartonellen (z.B. *B. henselae*) eine Endokarditis bedingen (Jacomino et al., 2002; Kempf und Krämer, 2008). Die Katze ist das Reserviertier für *B. henselae* sowie für *B. clarridgeiae* und vermutlich für *B. koehlerae*. Katzen zeigen dabei in der Regel keine klinischen Symptome, können jedoch eine langanhaltende Bakteriämie von Wochen bis Monaten (auch bis über 1 Jahr) entwickeln (Breitschwerdt und Kordick, 2000; Chomel et al., 2006; Kempf und Krämer, 2008).

Bei einer Bartonellose ist die serologische Untersuchung (IFAT) die am häufigsten verwendete diagnostische Methode. Jedoch sind auch direkte Nachweisverfahren (PCR, histologische Untersuchung bei angioproliferativen Prozessen oder in vitro Kultivierung) möglich (Anderson und Neuman, 1997).

3 Material und Methoden

3.1 Standortauswahl

Die Standortauswahl der Stadtparks wurde nach festen Kriterien vorgenommen. Die Parks sollten in bayerischen Städten >100.000 Einwohnern liegen, großteils abgeschlossen sein und eine Fläche mit hohem freizeitleichen Nutzwert darstellen. Weiterhin sollten die Grünflächen ganz oder teilweise gärtnerisch gepflegt werden. Die Wahl fiel auf sieben Innenstadtparks in München, Regensburg, Ingolstadt und Augsburg sowie einer freizeitleichen Nutzfläche im Großraum München. Als Vergleich zu den gärtnerisch gepflegten Parks wurde zudem der ausschließlich forstwirtschaftlich genutzte Schlosspark in Berg gewählt. Die Standorte wurden monatlich von April bis September 2009 beprobt. Zusätzlich wurden fünf ausgewählte Standorte (Englischer Garten, Nymphenburger Schlosspark, Dörnbergpark, Glacis und Schlosspark in Berg) ein weiteres Jahr von Mai bis September 2010 untersucht.

3.1.1 München



(48°11'40.57"N, 11°25'07.49"O)

**Abbildung 3: Langwieder
Seenplatte**

Langwieder Seenplatte (M1):

Die Langwieder Seenplatte ist ein Naherholungsgebiet im Westen von München. Es umfasst neben dem Langwieder See zwei künstlich angelegte Gewässer (Lußsee und Birkensee) sowie Liegewiesen und abgegrenzte Naturschutzbereiche. Dieses Naherholungsgebiet wird besonders in den warmen Monaten des Jahres intensiv durch Badegäste genutzt. Die Vegetation besteht neben den gärtnerisch gepflegten Liegewiesen aus einer dichten Kraut- und Strauchzone sowie hohem Bewuchs (u.a. Gemeine Hasel (*Corylus avellana*),

Feldahorn (*Acer campestre*), Bergahorn (*Acer pseudoplatanus*)) an den Randbereichen und den Seeufern (Abb. 3). Zecken wurden entlang des Ost- und Südufers des Langwieder Sees sowie an der großen Liegewiese südlich des Langwieder Sees gefangen.



(48°09'01.73"N, 11°35'24.19"O)

Abbildung 4: Englischer Garten

Englischer Garten (M2):

Der Englische Garten ist eine über 4 km² große Parkanlage im Herzen von München und zählt zu einer der größten innerstädtischen Parkanlagen weltweit. Dieser am

Westufer des Flusses Isar gelegene Stadtpark mit ca. 80 km langen Wander- und Reitwegen wird aufgrund seiner zahlreichen Freizeitmöglichkeiten täglich stark von Besuchern und Touristen frequentiert. Beprobt wurde der gärtnerisch gepflegte Südteil des Englischen Gartens (Nähe des Monopteros), welcher vom Nordteil (Hirschau) durch eine stark befahrene Ringstraße getrennt ist. Neben großen Rasenflächen finden sich beidseits der Wege eine Vielzahl an Laubbäumen (u.a. Sommer-Linde (*Tilia platyphyllos*), Feldahorn (*Acer campestre*), Gemeine Hasel (*Corylus avellana*)) und schattige Bereiche mit dichten Kraut- und Strauchzonen (Abb. 4).

Nymphenburger Schlosspark (M3):

Der Schlosspark Nymphenburg bildet den axialsymmetrisch aufgebauten Gartenbereich des gleichnamigen Schlosses im westlichen Teil von München. Um den intensiv gärtnerisch gestalteten Bereich entlang des Kanals erstreckt sich ein weitgehend naturbelassener Park, welcher Heimat für eine Vielzahl an Wildtieren darstellt und durch eine Betonmauer zu allen Seiten abgegrenzt ist. Ein Laubwald (u.a. Rotbuche (*Fagus sylvatica*), Spitzahorn (*Acer platanoides*), Sommer-Linde (*Tilia platyphyllos*)) mit dichtem Bodenbewuchs prägt das typische Vegetationsbild des naturbelassenen Parkstücks. Auch Kraut- und Strauchzonen



(48°09'38.93"N, 11°29'33.31"O)

sind seitlich der Wege zu finden (Abb. 5). Die Beprobungsfläche für die Zeckensammlung wurde nördlich des Kanals im naturbelassenen Parkbereich gewählt.

Abbildung 5: Nymphenburger Schlosspark

3.1.2 Regensburg



(49°00'55.72"N, 12°05'08.89"O)

Abbildung 6: Dörnbergpark

Dörnbergpark (R1):

Der Dörnbergpark ist ein relativ kleiner (7,4 ha), von einer Betonmauer umgebener Stadtpark im Zentrum von Regensburg (Abb. 6). Dieser seit den 40-er Jahren des

20. Jahrhunderts für die Öffentlichkeit zugängliche Innenstadtpark besteht zentral aus großen gärtnerisch gepflegten Rasenflächen mit einer breiten und schattigen Kraut- und Strauchzone an den Randgebieten mit verschiedenen Laub- und Nadelbäumen (überwiegend Rotbuche (*Fagus sylvatica*), Spitzahorn (*Acer platanoides*)). Er wird besonders intensiv durch Jogger und Spaziergänger mit Hunden genutzt. Zecken wurden im gesamten Park an den Randbereichen geflaggt.

Donaupark (R2):

Die größte städtische Grünanlage in Regensburg stellt der Donaupark dar. Dieser Park liegt im Westen von Regensburg und geht direkt in die Grünflächen des Donauufers über. Freizeitlich intensiv genutzt wird dieser Park durch Jogger und

Spaziergänger sowie durch Sportfischer am zentral gelegenen See. Beidseits der zahlreichen Wege befinden sich dichte Kraut- und Strauchzonen mit



(49°01'31.25"N, 12°03'21.23"O)

verschiedenen Laubbäumen (u.a. Sitzahorn (*Acer platanoides*), Feldahorn (*Acer campestre*)). Zecken wurden beidseits der Wege am südlichen und östlichen Ufer gesammelt (Abb. 7).

Abbildung 7: Donaupark

3.1.3 Ingolstadt



(48°45'59.92"N, 11°24'43.72"O)

Abbildung 8: Glacis

Glacis (I1):

Ursprünglich als Festungsring gebaut, stellt der „Glacis“ heute einen 6km langen Grünstreifen dar, welcher die historische Innenstadt von Ingolstadt vollständig

umschließt und in sechs Parkeinheiten eingeteilt wird. Zecken wurden primär in der Parkeinheit „Hepp“, nordöstlich der Innenstadt, gesammelt; bei der ersten Probennahme im April 2009 zusätzlich auch in der Parkeinheit „Künettegraben“. Die Vegetation besteht größtenteils aus einem Laubwald (u.a. Spitzahorn (*Acer platanoides*), Rotbuche (*Fagus sylvatica*), Rosskastanie (*Aesculus hippocastanum*)) mit dichter Bodenvegetation (Abb. 8). Der „Glacis“ wird von einer Vielzahl an Wegen durchzogen, die intensiv durch Jogger und Spaziergänger genutzt werden. Die Grünflächen wurden während der Sammelperiode einmal jährlich (Juli) gärtnerisch gepflegt (eigene Beobachtung).

Luitpoldpark (I2):

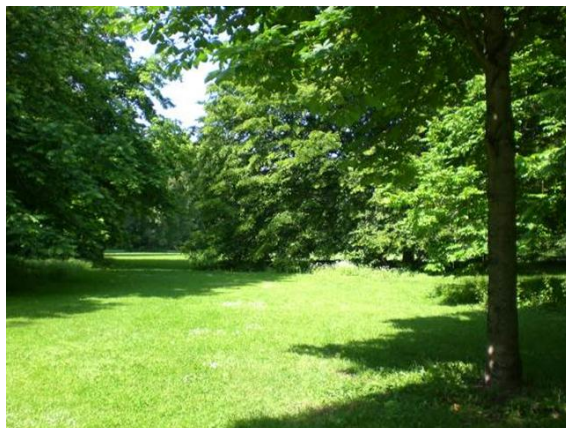
Der Luitpoldpark stellt eine weitere Parkeinheit des "Glacis" im Süden der Innenstadt von Ingolstadt dar (Abb. 9). Dieser jenseits der Donau gelegene Stadtpark hat jedoch im Gegensatz zu der ringförmigen Grünfläche einen stärkeren Parkcharakter mit gärtnerisch gepflegten Rasenflächen und einer begrenzenden Kraut- und Strauchzone an den Randbereichen. Den südlicheren Teil bildet ein naturbelassener Parkbereich mit zahlreichen Laubbäumen (u.a. Bergahorn (*Acer pseudoplatanus*), Rotbuche (*Fagus sylvatica*), Rosskastanie



(48°45'16.41"N, 11°25'31.44"O)

(*Aesculus hippocastanum*)) und dichter Bodenvegetation. Zecken wurden sowohl an den Randbereichen der gärtnerisch gepflegten Rasenflächen, als auch in den naturbelassenen Teilen des Parks gesammelt.

Abbildung 9: Luitpoldpark

3.1.4 Augsburg

(48°21'29.91"N, 10°52'54.13"O)

Abbildung 10: Wittelsbacher Park

Wittelsbacher Park (A):

Der Wittelsbacher Park stellt die größte zentrale Grünfläche in Augsburg dar und wird besonders in den Sommermonaten intensiv freizeithlich genutzt. Der Park

besteht aus einem nord-östlichen Stadtgarten, dem eigentlichen Wittelsbacher Park, und einem naturbelassenen Abhang zum Wertachtal. Proben für diese Studie wurden über den ganzen Park verteilt gesammelt. Laubbäume (u.a. Rotbuche (*Fagus sylvatica*), Spitzahorn (*Acer platanoides*), die Gemeine Hasel (*Corylus*

avellana)), Kraut- und Strauchzonen sowie große Rasenflächen stellen die charakteristische Vegetation dieser Grünanlage dar (Abb. 10).

3.1.5 Berg am Starnberger See



(47°57'43.85"N, 11°20'53.35"O)

Abbildung 11: Schlosspark

Schlosspark (B):

Der Schlosspark liegt in der Gemeinde Berg am Starnberger See, süd-westlich von München. Dieser forstwirtschaftlich gepflegte Park wird sowohl durch Badegäste

und Spaziergänger in den Sommermonaten als auch touristisch durch die in dem Park gelegene Votivkapelle intensiv benutzt. Die Vegetation besteht aus einem schattigen Mischwald (u.a. Rotbuche (*Fagus sylvatica*), Bergahorn (*Acer pseudoplatanus*), Gemeine Fichte (*Picea abies*)) mit dichtem Bodenbewuchs (Abb. 11). Die Zecken wurden hauptsächlich auf den Grünflächen östlich des Parkweges gesammelt.

3.2 Probennahme

Aktiv nach einem Wirtstier suchende Zecken wurden mittels der Flaggmethode mit einer 1m² großen Flagge aus Baumwollmollton direkt von der Vegetation gesammelt. Für jede Probenahme wurden zwei getrennte Sammlungen vorgenommen und dokumentiert. Die erste Sammlung galt der Zeckendichtemessung (adulte Zecken und Nymphen/100m²) und die zweite Sammlung der Erlangung der notwendigen Stichprobengröße für die Prävalenzuntersuchungen. Bei der Zeckendichtemessung wurden jeweils an 40 verschiedenen und über den Stadtpark verteilten Stellen eine 2,5m² große Fläche beprobt. Für die Prävalenzuntersuchung wurde eine Stichprobengröße von 30 Individuen pro Entwicklungsstadium und Geschlecht (adult weiblich und männlich, Nymphen und Larven), pro Standort und pro Monat angestrebt. Zecken

aus der Zeckendichtemessung wurden in die Stichprobe für die Prävalenzuntersuchung mit eingeschlossen. Gesammelte Zecken wurden in 70%igem Ethanol bis zur weiteren Untersuchung im Labor gelagert.

3.3 Laboruntersuchungen

3.3.1 Zeckenbestimmung

Die Zecken wurden im Labor zweifach in Aqua dest. gewaschen, auf einem Zellstofftuch getrocknet und in 2ml Probengefäße verbracht. Adulte Tiere und Nymphen wurden individuell behandelt, Larven in Pools von maximal fünf Individuen. Die Bestimmung der Zecken wurde anhand von morphologischen Kriterien (Hillyard, 1996) vorgenommen. Anschließend wurden sie bis zur weiteren molekularbiologischen Untersuchung bei -20°C eingefroren.

3.3.2 Molekularbiologische und bioinformatische Methoden zur Identifikation von Pathogen-DNA in *Ixodes ricinus*

3.3.2.1 DNA-Isolierung

Zecken (Adulte und Nymphen individuell und Larven in Pools zu max. 5 Individuen) wurden mit 80µl PBS und einer 5mm Stahlkugel im TissueLyser homogenisiert. Zur Verhinderung von Kontaminationen wurden die Stahlkugeln nach Gebrauch mehrfach unter fließendem Aqua dest. gewaschen, eine Stunde unter eine UV-Lampe verbracht und mindestens drei Stunden für 180°C im Heißluftsterilisator getrocknet.

Zur Isolierung der DNA wurde der QIAamp DNA Mini Kit entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers für Gewebeproben mit einer Modifikation im Elutionsschritt verwendet. Zur Erhöhung der quantitativen DNA Ausbeute wurde anstelle eines Elutionsschrittes à 200µl in zwei Schritten à 100µl eluiert. Zur Kontrolle des Extraktionsprozesses wurde in jeder Extraktion (24 oder 48 Proben) eine Negativkontrolle mit 80µl PBS integriert. Eine quantitative und qualitative Kontrolle der DNA Isolierung wurde spektrophotometrisch mittels NanoDrop®ND-1000 durchgeführt.

3.3.2.2 Polymerase Kettenreaktion

Die Untersuchungen der Zeckenproben auf Pathogen-DNA wurde mittels Polymerase Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) durchgeführt. Bereits publizierte und evaluierte spezifische Primer wurden für die Untersuchungen verwendet (Tab. 6). In jedem PCR-Lauf wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle (molekularbiologisch reines Wasser) integriert. Die Proben aus 2009 wurden auf die Anwesenheit von DNA von *Babesia* spp., *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. und *Bartonella* spp. untersucht und die Proben aus 2010 zusätzlich auf DNA von *Babesia* spp. und *A. phagocytophilum*.

Tabelle 6: Verwendete Primer zur Ermittlung von Pathogen-DNA in Ixodes ricinus

Erreger	Primer	Referenz
<i>Babesia</i> spp.	BJ1	5'-GTCTTGTAATTGGAATGATGG-3'
	BN2	5'-TAGTTTATGGTTAGGACTACG-3'
<i>A. phag.</i>	ApMsp2f	5'-ATGGAAGGTAGTGTGGTTATGGTATT-3'
	ApMsp2r	5'-TTGGTCTTGAAGCGCTCGTA-3'
	ge3a	5'-CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC-3'
	ge10r	5'-TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC-3'
	ge9f	5'-AACGGATTATCTTTATAGCTTGCT-3'
	ge2	5'-GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG-3'
<i>Rickettsia</i> spp.	RpCS.877p	5'-GGGGGCCTGCTCACGGCGG-3'
	RpCS.1258n	5'-ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA-3'
	120-2788	5'-AAACAATAATCAAGGTACTGT-3'
	120-3599	5'-TACTTCCGGTTACAGCAAAGT-3'
<i>Bartonella</i> spp.	BA325s	5'-CTTCAGATGATGATCCCAAGCCTTCTGGCG-3'
	BA1100as	5'-GAACCGACGCCCTGCTTGCAAAGCA-3'

3.3.2.2.1 Untersuchung auf DNA von *Babesia* spp.

Zecken aller Entwicklungsstadien aus 2009 (n= 4.459) und 2010 (n= 2.134) wurden auf die Anwesenheit von DNA von *Babesia* spp. untersucht. Als Untersuchungsmethode wurde eine konventionelle PCR nach Casati et al. (2006) verwendet. Diese PCR amplifiziert ein 411-452bp großes Teilstück des *18S rRNA* Gens und wurde für *B. microti*, *Babesia* sp. EU1, *B. equi*, *B. canis canis*, *B. divergens*, *B. major* und *B. bigemina* validiert (Casati et al., 2006). Der HotStarTaqPlus DNA Polymerase Kit wurde für die PCR verwendet (Tab. 7) Als Positivkontrolle wurde sowohl ein DNA-Extrakt aus Blut einer natürlich infizierten Kuh mit *B. divergens* als auch ein DNA-Extrakt aus Blut von experimentell infizierten BALB/c Mäusen mit *B. microti* (king college strain von

Sarah Randolph, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. E. Siński, Warschau) verwendet. Die Amplifikation wurde in dem Thermocycler Mastercycler® gradient durchgeführt. Die physikalischen Bedingungen der PCR können Tab. 8 entnommen werden.

Tabelle 7: Pipettierschema der konventionellen PCR mit dem Ziel-Gen 18S rRNA von *Babesia spp.*

Reagenzien pro Reaktion (Casati et al. 2006):		
Puffer 10x	5,0	µl
dNTP-Mix (jeweils 10mM)	1,0	µl
Primer BJ1 (100µM)	0,5	µl
Primer BN2 (100µM)	0,5	µl
Molekularbiologisch reines H ₂ O	37,75	µl
Taq Polymerase (5U/µl)	0,25	µl
Probe	5,0	µl
Gesamtvolumen	50,0	µl

Tabelle 8: Physikalische Bedingungen der konventionellen PCR mit dem Ziel-Gen 18S rRNA von *Babesia spp.*

<i>Babesia spp.</i> (Casati et al. 2006)		
Initiale Denaturierung	5min	95°C
Denaturierung	30sek	94°C
Annealing	30sek	55°C
Elongation	40sek	72°C
Finale Elongation	5min	72°C

} 40x

3.3.2.2 Untersuchung auf DNA von *Anaplasma phagocytophilum*

Die in den Jahren 2009 (n= 3.685) und 2010 (n= 1.884) gefangene adulte Zecken und Nymphen wurden auf die Anwesenheit von DNA von *A. phagocytophilum* untersucht. Aufgrund fehlender ovarieller Transmission von *A. phagocytophilum* in *I. ricinus* wurden Larvenpools in diese Untersuchung nicht integriert. Alle Proben wurden mittels real-time PCR auf ein 77-bp großes Teilstück des Ziel-Gens *msp2* gescreent (Courtney et al., 2004), welches für *A. phagocytophilum* spezifisch ist. Real-time PCRs wurden auf dem Thermocycler AB-7500 Real-Time PCR System durchgeführt. SYBR®-Green wurde dafür als detektierbarer

Farbstoff ausgewählt. Der fertige Master Mix SYBR®-Green PCR Master Mix (2x) wurde verwendet (Tab. 9).

Tabelle 9: Pipettierschema der real-time PCR mit dem Ziel-Gen *msp2* von *Anaplasma phagocytophilum*.

Reagenzien pro Reaktion (Courtney et al. 2004):		
SYBR®-Green PCR Master Mix (2x)	25,0	µl
Primer ApMsp2f (10µM)	1,5	µl
Primer ApMsp2r (10µM)	1,5	µl
Molekularbiologisch reines H ₂ O	17	µl
Probe	5,0	µl
Gesamtvolumen	50,0	µl

Eine Probe wurde als positiv gewertet, wenn ein ct-Wert kleiner 39,0 ermittelt wurde und die Schmelztemperaturanalyse ein Fluoreszenzmaximum im Temperaturbereich von 76.0 bis 79.0°C zeigte. Als Temperaturprotokoll wurde die vom Hersteller empfohlene Voreinstellung der Software verwendet (Tab. 11). Als Positivkontrolle wurde DNA von *A. phagocytophilum*-positiven Zecken aus einer früheren Studie eingesetzt.

Tabelle 10: Pipettierschema der nested PCR mit dem Ziel-Gen *16S rRNA* von *Anaplasma phagocytophilum*.

Reagenzien pro Reaktion (Massung et al. 1998):				
	1. Amplifikation		2. Amplifikation	
Puffer 10x	5,0	µl	5,0	µl
MgCl ₂ (25mM)	1,0	µl	1,0	µl
dNTP-Mix (jeweils 10mM)	1,0	µl	1,0	µl
Primer ge3a bzw. ge9f (100µM)	0,5	µl	0,5	µl
Primer ge10r bzw. ge2 (100µM)	0,5	µl	0,5	µl
Molekularbiologisch reines H ₂ O	36,5	µl	40,5	µl
Taq Polymerase (5U/µl)	0,5	µl	0,5	µl
Probe bzw. Amplifikat aus 1. Reaktion	5,0	µl	1,0	µl
Gesamtvolumen	50,0	µl	50,0	µl

Zur weiteren Spezifizierung genetisch sehr ähnlicher Anaplasmen wurden aus jedem Standort fünf *msp2*-positive Zecken ausgewählt (n= 45) und mittels einer nested PCR nach Massung et al. (1998) untersucht. Das erste Primer-Paar *ge3a/ge10r* amplifiziert ein 932-bp großes Fragment des *16S rRNA*-Gens, das

zweite Primer-Paar ge9f/ge2 ein 546-bp großes Teilstück. Als Reaktionskit wurde der HotStarTaq DNA Polymerase Kit verwendet (Tab. 10). Der Thermocycler Mastercycler® gradient wurde für alle Reaktionen benützt. Physikalische Bedingungen der PCR sind beschrieben in Tabelle 12.

Tabelle 11: Physikalische Bedingungen der real-time PCR mit dem Ziel-Gen msp2 von *Anaplasma phagocytophilum*.

<i>A. phagocytophilum</i> (Courtney et al. 2004)		
Initiale Aktivierung	10min	95°C
Denaturierung	15sek	95°C
Annealing und Elongation	1min	60°C
Schmelzkurve	15sek	95°C
	1min	g.a. bis 60°C
	30sek	95°C
Finale Elongation	15sek	60°C

g. a.: graduell ansteigend

Tabelle 12: Physikalische Bedingungen der nested PCR mit dem Ziel-Gen 16S rRNA von *Anaplasma phagocytophilum*.

<i>A. phagocytophilum</i> (Massung et al. 1998)		
1. Amplifikation		
Initiale Denaturierung	15min	95°C
Denaturierung	30sek	94°C
Annealing	30sek	55°C
Elongation	1min	72°C
Finale Elongation	5min	72°C
2. Amplifikation		
Initiale Denaturierung	15min	95°C
Denaturierung	30sek	94°C
Annealing	30sek	55°C
Elongation	1min	72°C
Finale Elongation	5min	72°C

3.3.2.2.3 Untersuchung auf DNA von *Rickettsia* spp.

Auf rickettsiale DNA wurden die Zecken aller Entwicklungsstadien aus 2009 untersucht (n= 4.459). Eine konventionelle PCR, welche ein 380-bp großes Fragment des *gltA*-Gens von *Rickettsia* spp. amplifiziert, wurde dafür ausgewählt (Regnery et al., 1991). Das Expand High Fidelity plus PCR System wurde verwendet und die Amplifikation fand auf dem Thermocycler Mastercycler®

gradient statt (Tab. 13 und 15).

Proben, die nach Sequenzanalyse als *R. monacensis* oder *Rickettsia* spp. bewertet wurden, wurden zur weiteren Spezifizierung mit einer konventionellen PCR mit dem Ziel-Gen *ompB* untersucht (Roux und Raoult, 2000). Diese PCR amplifiziert ein 765-bp Teilstück des *ompB*-Gens von *Rickettsia* spp.. Reagenzien und Thermocycler wurden der *gltA*-PCR entsprechend verwendet (Tab. 14 und 16). Durch Sequenzanalyse bestätigte *R. helvetica* positive Zecken aus einer früheren Studie wurden als Positivkontrolle verwendet.

Tabelle 13: Pipettierschema der konventionellen PCR mit dem Ziel-Gen *gltA* von *Rickettsia* spp.

Reagenzien pro Reaktion (Regnery et al. 1991):		
Puffer 5x	10,0	µl
MgCl ₂ (25mM)	3,0	µl
dNTP-Mix (jeweils 10mM)	1,0	µl
Primer RpCS.877p (100µM)	0,25	µl
Primer RpCS.1258n (100µM)	0,25	µl
Molekularbiologisch reines H ₂ O	30	µl
Taq Polymerase (5U/µl)	0,5	µl
Probe	5,0	µl
Gesamtvolumen	50,0	µl

Tabelle 14: Pipettierschema der konventionellen PCR mit dem Ziel-Gen *ompB* von *Rickettsia* spp.

Reagenzien pro Reaktion (Roux and Raoult et al. 2000):		
Puffer 5x	10,0	µl
MgCl ₂ (25mM)	3,0	µl
dNTP-Mix (jeweils 10mM)	1,0	µl
Primer 120-2788 (100µM)	0,25	µl
Primer 120-3599 (100µM)	0,25	µl
Molekularbiologisch reines H ₂ O	30	µl
Taq Polymerase (5U/µl)	0,5	µl
Probe	5,0	µl
Gesamtvolumen	50,0	µl

Tabelle 15: Physikalische Bedingungen der konventionellen PCR mit dem Ziel-Gen gltA von *Rickettsia* spp.

<i>Rickettsia</i> spp. (Regnery et al. 1991)			
Initiale Denaturierung	3min	94°C	
Denaturierung	20sek	95°C	} 35x
Annealing	30sek	48°C	
Elongation	2min	60°C	
Finale Elongation	7min	72°C	

Tabelle 16: Physikalische Bedingungen der konventionellen PCR mit dem Ziel-Gen ompB von *Rickettsia* spp.

<i>Rickettsia</i> spp. (Roux and Raoult et al. 2000)			
Initiale Denaturierung	3min	94°C	
Denaturierung	30sek	95°C	} 40x
Annealing	30sek	50°C	
Elongation	90sek	68°C	
Finale Elongation	7min	72°C	

3.3.2.2.4 Untersuchung auf DNA von *Bartonella* spp.

Zecken aller Entwicklungsstadien aus 2009 (n= 4.459) wurden auf die Anwesenheit von DNA von *Bartonella* spp. mittels einer konventionellen PCR nach Maggie et al. (2006) mit den Primern BA325s und BA1100as untersucht. Mit dieser PCR kann ein 420-780bp großes Teilstück des *16S-23S rRNA* (ITS) Gens von klinisch relevanten Bartonellen (*B. clarridgeiae*, *B. elizabethae*, *B. henselae*, *B. quintana*, *B. vinsonii berkhoffii* und *B. bovis*) nachgewiesen werden. Pipettierschema, verwendete Reagenzien sowie physikalische Bedingungen der PCR sind denen von *Babesia* spp. identisch (siehe Kapitel 3.3.2.2.1). Als Positivkontrollen kamen *B. henselae*-positive Flöhe aus einer früheren Studie zum Einsatz.

3.3.2.3 Agarose Gelelektrophorese und DNA-Aufreinigung

Die Amplifikate der konventionellen und nested PCRs wurden mittels Agarose Gelelektrophorese bewertet. Bei allen Reaktionen wurde ein mit GelRed™ gefärbtes 2%-iges Agarose Gel (2g Agarose auf 100ml TAE-Puffer) verwendet. Visualisiert wurden die Produkte unter UV-Licht. Als Maßstab wurde bei jeder

Gelelektrophorese ein standardisierter DNA-Ladder (Gene Ruler™ DNA Ladder Mix) eingesetzt. Positive Produkte gesuchter Länge aus dem jeweiligen PCR Ansatz wurden mittels eines industriellen Kits (QIAquick PCR Purification Kit) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.3.2.4 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die aufgereinigten PCR Produkte wurden spektrophotometrisch (NanoDrop®ND-1000) auf ihren DNA-Gehalt gemessen und auf eine Konzentration von 5ng DNA/µl mit molekularbiologisch reinem Wasser verdünnt. Positive PCR-Produkte von *Rickettsia* spp. und *Bartonella* spp. wurden mit einem Primer versendet, Produkte von *Babesia* spp. und *A. phagocytophilum* (*16S rRNA*) mit vorwärts und rückwärts Primer. Die Sequenzierung wurde von der Firma Eurofin MWG Operon durchgeführt. Zugesendete Sequenzen wurden mit ChromasLite® bewertet und mittels des BLASTn Tools vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) mit der GenBank verglichen. Bei *Babesia* spp. und *A. phagocytophilum* (*16S rRNA*) wurden die Sequenzen zusätzlich mit ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) abgeglichen, um Lesefehler im Sequenzierprozess auszuschließen.

3.4 Statistik

Die statistische Analyse wurde in Zusammenarbeit mit dem Stablab (Institut für Statistik der Ludwig-Maximilians-Universität, München) angefertigt. Um den Effekt der Variablen „Standort“, „Monat“ und „Entwicklungsstadium/Geschlecht der Zecke“ auf die Wahrscheinlichkeit einer Infektion zu ermitteln, wurde ein rechnerisches Modell gewählt, welches auf einer logistischen Regression basiert. Bei *A. phagocytophilum* und *Babesia* spp. ergab sich zudem noch die Variable „Untersuchungsjahr“. Die logistische Regression basiert auf einem generalisierten Linearen Modell mit Annahme einer Binomialverteilung für den Response und einer Modellierung über den log-Link. Tests auf signifikante Unterschiede zwischen Standorten, Monaten oder Entwicklungsstadien wurden mit simultanen paarweisen Tests mit Tukey Kontrasten berechnet. Zusätzlich wurden jährliche Unterschiede (zwischen 2009 und 2010) über Lineare Hypothesen (χ^2 -Tests) ermittelt. Bei *Babesia* spp. und *Rickettsia* spp. wurden Larvenpools in die

Untersuchungen miteinbezogen. Die logistische Regression basierte dabei auf der Annahme der Minimalinfektionsrate (d.h. die Annahme, dass nur eine Larve pro Pool infiziert war). Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant erachtet. Für *A. phagocytophilum* wurden wegen der teils sehr hohen fokalen Prävalenzen Konfidenzintervalle (95%) erstellt. Für die mittlere Gesamtprävalenz wurden gewichtete Konfidenzintervalle mit Bootstraps generiert, welche die 2-phasige Probensammlung in die Berechnung einbezieht und stärker der natürlichen Verteilung der Entwicklungsstadien von *I. ricinus* entsprechen. Weitere Konfidenzintervalle (95%) nach Clopper und Pearson (1934) wurden zudem für Teilprävalenzen der einzelnen Entwicklungsstadien erstellt. R Version 2.10.1 (R Development Core Team, 2009) und 2.12.1 (R Development Core Team, 2010) wurden als Software zur Berechnung verwendet.

3.5 Erstellung rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen von *Ixodes frontalis*

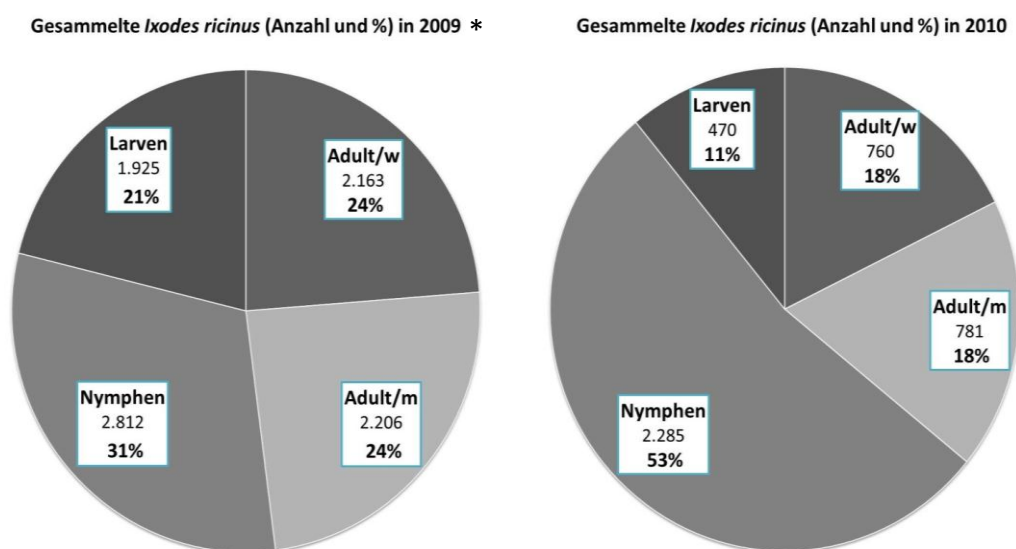
Ein Exemplar einer *I. frontalis* wurde nach der Speziesidentifikation in 70%igem Ethanol aufbewahrt. Zur besten Erhaltung des biologischen Präparates wurde die Zecke mit Hilfe einer aufsteigenden Acetonreihe (70%, 80%, 90%, 100% im Doppelansatz für jeweils 30min) entwässert. Sie wurde anschließend 24 Stunden in 100%igem Aceton belassen. Um Trocknungsartefakte zu vermeiden wurde das Präparat über CO₂ kritisch punktgetrocknet (Baltec CPD 030), daraufhin auf einen mit Leit-Tabs überzogenen Aluminiumprobenteller (Plano, Marburg) fixiert und mit dem Sputtergerät Baltec SCD 040 ca. 15nm dick mit Goldpalladium beschichtet. Die Beurteilung und Aufnahmen der *I. frontalis* wurde durch ein Zeiss Digital Scanning Microscope (DSM 950) mit angeschlossener Digitalkamera (Pentax K20D) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Anzahl gesammelter Zecken

In 2009 wurde über die gesamte Sammelperiode (April bis September 2009) an den neun beprobten Sammelorten 9.108 Zecken (2.164 weibliche, 2.206 männliche, 2.812 Nymphen, 1.925 Larven und ein Gynander) gefangen. Der Gynander wurde im August 2009 am Standort M1 gesammelt und konnte anhand von sowohl weiblichen als auch männlichen morphologischen Merkmalen bestimmt werden (nicht in Tab. 17 integriert). Die Speziesidentifizierung ergab bei 9.107 Zecken *I. ricinus* und bei einer weiblich adulten Zecke *I. frontalis*. Die Sammlungen für 2010 wurden in fünf Standorten über den Zeitraum Mai bis September 2010 durchgeführt. Es wurden 4.297 Zecken (760 weibliche, 782 männliche, 2.285 Nymphen und 470 Larven) gefunden. 4.296 waren davon *I. ricinus* sowie eine männlich adulte *I. hexagonus* (Tab. 17). Die prozentuale Verteilung der gefundenen Entwicklungsstadien zeigte für 2009 ein Verhältnis von 2 : 1,5 : 1 (Adulte : Nymphen : Larven) und 2010 ein Verhältnis von 3 : 5 : 1 (Abb. 12).

Abbildung 12: Anzahl gefundener *Ixodes ricinus* je Entwicklungsstadium im Vergleich 2009/2010

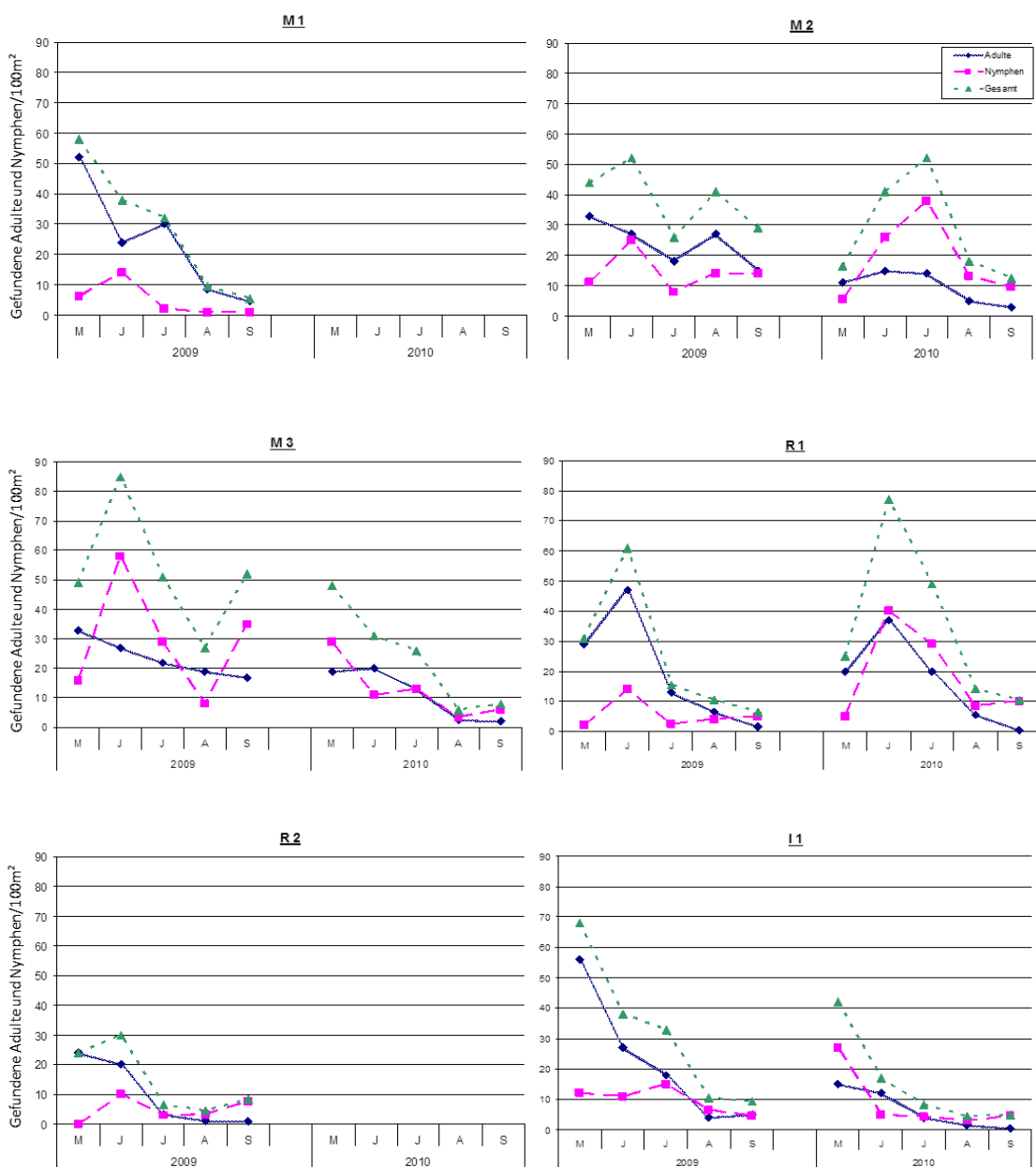


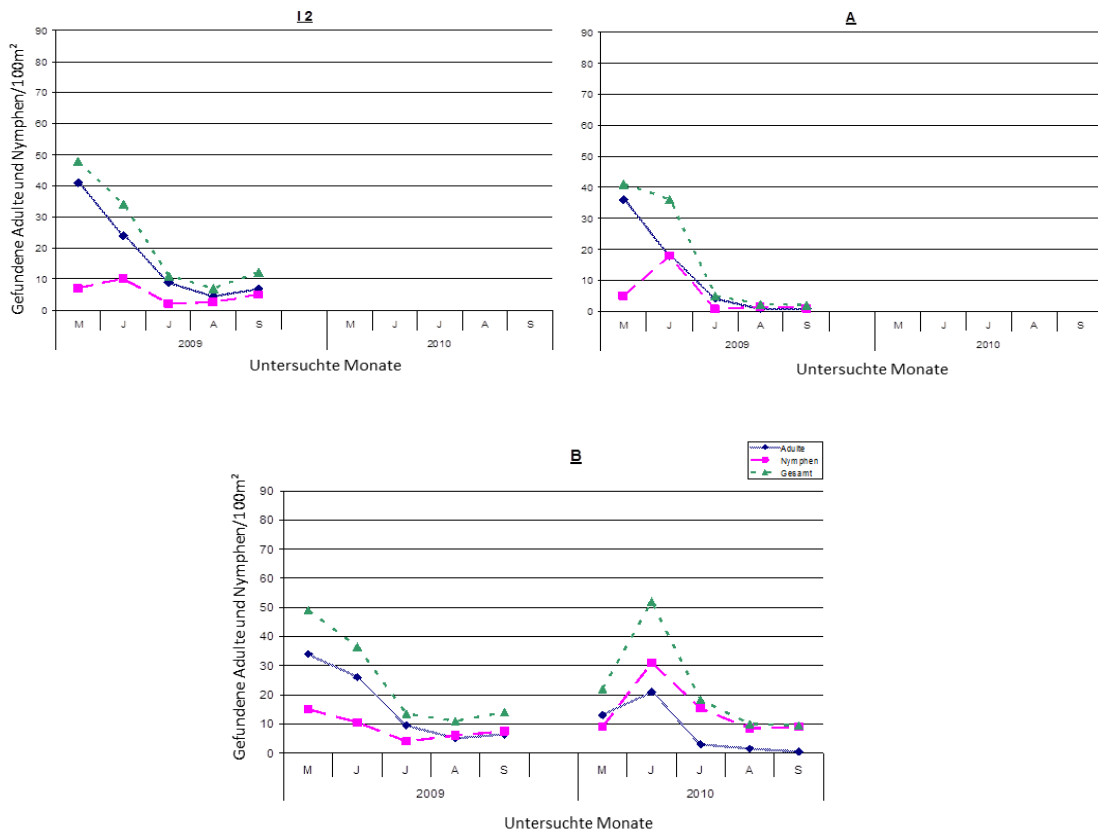
*Datensatz ohne Gynander

4.2 Zeckendichte

Die Zeckendichtemessung wurde für alle Standorte monatlich von Mai bis September 2009 und 2010 vorgenommen. Ergebnisse zur durchschnittlichen Zeckendichte für die beprobten Standorte sind in Publikation 1 (siehe Kapitel 4.4.1) zusammengefasst. Eine detaillierte Aufspaltung mit graphischer Darstellung zwischen Adulten Zecken und Nymphen findet sich in Abb. 13.

Abbildung 13: Zeckendichte (Adulte und Nymphen/100m²) je Standort im monatlichen Vergleich 2009/2010





4.3 Nano Drop

Die quantitative Messung der extrahierten DNA aus den Zeckenproben ergab Werte zwischen 0,1 und 44 ng DNA/ μ l Probe. Durchschnittliche Werte von 22,9 ng DNA/ μ l für adult weibliche Zecken, 5,6 ng DNA/ μ l für adult männliche Zecken, 3,3 ng DNA/ μ l für Nymphen und 3,5 ng DNA/ μ l für Larvenpools konnten ermittelt werden.

4.4 Publikationen

Die Ergebnisse bezüglich PCR Auswertung, Prävalenz der Krankheitserreger und statistischer Analyse wurden in zwei englischsprachigen Publikationen veröffentlicht. Zusätzlich zu der epidemiologischen Studie wurde der Fund einer *I. frontalis* in einem bayerischen Stadtpark publiziert.

Tabelle 17: Anzahl gefundener *I. ricinus* je Standort, Entwicklungsstadium und Monat, im Vergleich 2009/2010

Standort		Monat											
		April		Mai		Juni		Juli		August		September	
		2009	2010	2009	2010	2009	2010	2009	2010	2009	2010	2009	2010
M1	w	40	-	74	-	43	-	49	-	31	-	8	-
	m	64	-	106	-	65	-	47	-	32	-	17	-
	N	1	-	20	-	46	-	34	-	12	-	7	-
	L	0	-	0	-	2	-	6	-	8	-	2	-
M2	w	47	-	53	37	51	44	38	36	62	26	42	15
	m	64	-	56	54	38	41	44	32	34	29	34	17
	N	13	-	24	64	115	135	72	159	156	70	103	55
	L	0	-	1	0	32	0	37	2	135	0	80	7
M3	w	-	-	79	57	78	55	117	38	94	33	53	21
	m	-	-	71	84	78	52	103	38	80	41	37	11
	N	-	-	55	176	344	73	260	73	149	67	190	85
	L	-	-	29	41	60	29	9	110	9	2	37	15
R1	w	20	-	77	53	54	46	44	32	32	25	8	8
	m	25	-	85	39	75	52	34	47	34	18	7	7
	N	16	-	27	54	33	212	25	137	35	73	33	91
	L	0	-	0	0	43	4	4	4	164	45	149	16
R2	w	22	-	73	-	30	-	16	-	10	-	5	-
	m	33	-	52	-	48	-	17	-	7	-	0	-
	N	20	-	20	-	48	-	18	-	67	-	73	-
	L	0	-	0	-	15	-	85	-	8	-	22	-
I1	w	42	-	89	49	48	35	46	31	24	10	20	6
	m	44	-	83	43	41	41	38	21	36	9	24	7
	N	6	-	30	94	39	77	48	37	134	22	58	33
	L	0	-	3	1	28	10	7	0	62	74	63	95
I2	w	40	-	77	-	33	-	32	-	45	-	35	-
	m	67	-	80	-	55	-	40	-	27	-	24	-
	N	29	-	14	-	25	-	17	-	43	-	33	-
	L	14	-	17	-	8	-	11	-	33	-	45	-
A	w	-	-	57	-	35	-	26	-	10	-	2	-
	m	-	-	45	-	37	-	15	-	6	-	2	-
	N	-	-	19	-	55	-	12	-	14	-	16	-
	L	-	-	0	-	97	-	1	-	161	-	77	-
B	w	-	-	37	41	42	34	37	19	14	6	22	3
	m	-	-	30	46	59	39	37	7	14	4	15	3
	N	-	-	44	83	52	93	44	208	26	44	38	70
	L	-	-	2	0	218	0	109	1	27	4	7	10

4.4.1 Publikation 1

**Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* in Bavarian
public parks, Germany**

Sabine Schorn¹, Kurt Pfister¹, Holger Reulen², Monia Mahling², Juliane Manitz², Claudia Thiel¹,
Cornelia Silaghi¹

Ticks and Tick-borne Diseases (2011) 2, 196– 203.

¹Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-University, Munich,
Germany

²Statistical Consulting Unit, Department of Statistics, Ludwig-Maximilians-University, Munich,
Germany

**Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* in
Bavarian public parks, Germany**

Sabine Schorn¹, Kurt Pfister¹, Holger Reulen², Monia Mahling², Juliane Manitz²,
Claudia Thiel¹, Cornelia Silaghi¹

¹Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-
University, Munich, Germany

²Statistical Consulting Unit, Department of Statistics, Ludwig-Maximilians-
University, Munich, Germany

Corresponding author:

Sabine Schorn

Chair of Comparative Tropical Medicine and Parasitology

Leopoldstraße 5

80802 Munich

Germany

Tel.: +49 89 21 80 28 16

Fax: +49 89 21 80 36 23

E-mail address: sabine.schorn@tropa.vetmed.uni-muenchen.de

Abstract

Previous studies have shown that public parks provide extraordinary habitats for ticks and tick-borne pathogens. Therefore the aim of this study was to investigate the tick abundance (ticks/100m²) in urban areas and the prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*. Collection of ticks was performed by the flagging method in selected Bavarian public parks in a 2-year survey. DNA from 30 ticks of each developmental stage, sampling site and month was extracted and screened by specific real-time PCR for *A. phagocytophilum*. Selected positive samples were further genetically differentiated by nested PCR, targeting the *16S rRNA* gene. A total of 13,403 *Ixodes ricinus* were collected with an average tick abundance of 15 to 53 ticks/100m² in 2009 and 15 to 35 ticks/100m² in 2010, depending on the sampling site. DNA of *A. phagocytophilum* was detected in 11.6% (n= 146) and 8.5% (n= 50) of adult females, 13.3% (n= 164) and 9.2% (n= 51) of adult males as well as 5% (n= 60) and 3.9% (n= 29) of nymphs for 2009 (n= 3,685) and 2010 (n= 1,884), respectively. *16S rRNA* gene analysis revealed six different genetic variants, of which two were 100% identical to known sequences in humans. The results give strong evidence that the occurrence of *A. phagocytophilum* in *I. ricinus* is highly variable in different habitat types due to geographical, climatic and biological factors as well as different genetic variants of *A. phagocytophilum* circulated in ticks with a noticeable habitat and host tropism.

Keywords

Anaplasma phagocytophilum, *Ixodes ricinus*, public parks, PCR, *16S rRNA*, epidemiology

Introduction

Public parks - the green lung of European cities - represent local hot spots for recreational activities with a high number of daily visitors, especially in the warmer seasons of the year. These circumscribed recreational areas are of increasing scientific interest with regard to tick density and tick-borne pathogens (Comer et al., 2001; Junttila et al., 1999).

Ixodes (I.) ricinus is the most common tick species in Europe and several kinds of small, medium-sized and large mammals, including humans, as well as birds and reptiles can serve as hosts (Hillyard, 1996). It has great medical importance as vector for several viral, bacterial and protozoan pathogens. One of them is *Anaplasma (A.) phagocytophilum*, an obligate, intracellular α -proteobacterium of the order Rickettsiales. Formerly differentiated in *Ehrlichia (E.) phagocytophilum*, *E. equi* and the human granulocytic ehrlichiosis agent, it is now reorganized as one single species (Dumler et al., 2001). Transovarial transmission of *A. phagocytophilum* in *I. ricinus* seems to be not-existent or inefficient (Ogden et al., 1998). Therefore, a competent reservoir host is obligatorily required for the maintenance of the life cycle of this bacterial pathogen.

Until *A. phagocytophilum* was identified as the etiological agent of human granulocytic anaplasmosis (HGA), a febrile disease with nearly 3,000 clinical cases in the USA since 1994 (Chen et al., 1994; Doudier et al., 2010), the pathogenicity of the bacterium was thought to be limited to animals. *A. phagocytophilum* causes granulocytic anaplasmosis in horses, dogs and cats and tick-borne fever in domestic ruminants (Woldehiwet, 2010). In Europe, HGA is classified as an emerging disease with nearly 70 clinical cases since the first confirmed case in 1997 in Slovenia (Doudier et al., 2010; Petrovec et al., 1997). However, no clinical case of HGA has been documented in Germany until now, even though seroprevalences of 1.9% in normal and up to 16% in human risk populations as well as prevalences up to 5.4% in *I. ricinus* have been described (Fingerle et al., 1997; Hildebrandt et al., 2010; Oehme et al., 2002). A noteworthy aspect for city parks in Germany is the high prevalence of *A. phagocytophilum* up to 9.1% in *I. ricinus* in the 'English Garden' in the city of Munich, which differed significantly from natural forest areas (Silaghi et al., 2008). This result raised the

question: is this only a local phenomenon in the ‘English Garden’ in Munich or can we detect high prevalences of *A. phagocytophilum* also in other urban habitats in Germany? This would support our hypothesis of an urban life-cycle for *A. phagocytophilum*, which may be distinguished from the sylvan life-cycle as to competent reservoir host and infection rate of the ticks.

Therefore the aim of this study was to investigate public parks in five cities in Bavaria, Germany, with regard to tick abundance, prevalence of *A. phagocytophilum* and identification of *16S rRNA* gene variations. This information about the ecology of *I. ricinus* and the occurrence of *A. phagocytophilum* will provide an essential prerequisite for a medical risk assessment in the future with a focus on recreationally used urban areas.

Material and Methods

Study sites:

In 2009, nine different public parks in the five Bavarian cities Munich, Regensburg, Ingolstadt, Augsburg and Berg at Lake Starnberg (Fig.1) were investigated monthly from April to September. Additionally, five selected sampling sites (M2, M3, R1, I1 and B) were investigated from May to September 2010. Each site was sampled at least once per month to achieve the sampling size required for the prevalence study.

Sampling sites A, M2, M3, R1, R2, I1 and I2 were located in public parks in the central area of the respective cities. A, M2, M3, R1 and I1 were bounded by streets and without any connection to forest areas. M3 and R1 were additionally surrounded by a concrete park wall. On the contrary, sampling sites I2 and R2 are directly connected to forest areas. Sampling site M1 is a heavily frequented recreational area, with transition to forest areas. Sampling site B is a forest-like area, which is frequently used for hiking and biking and surrounded by a concrete wall. The vegetation of all sampling areas consists predominantly of deciduous trees, bushes and groomed lawns (not sampling site B). Sampling sites B and M3 were left in more natural state with a higher density of trees as well as thick and leafy undergrowth. Sites A, M1, M2, I2, R1 and R2 were totally, M3 and I1 partly maintained by gardening. Sampling site B was only maintained silviculturally.

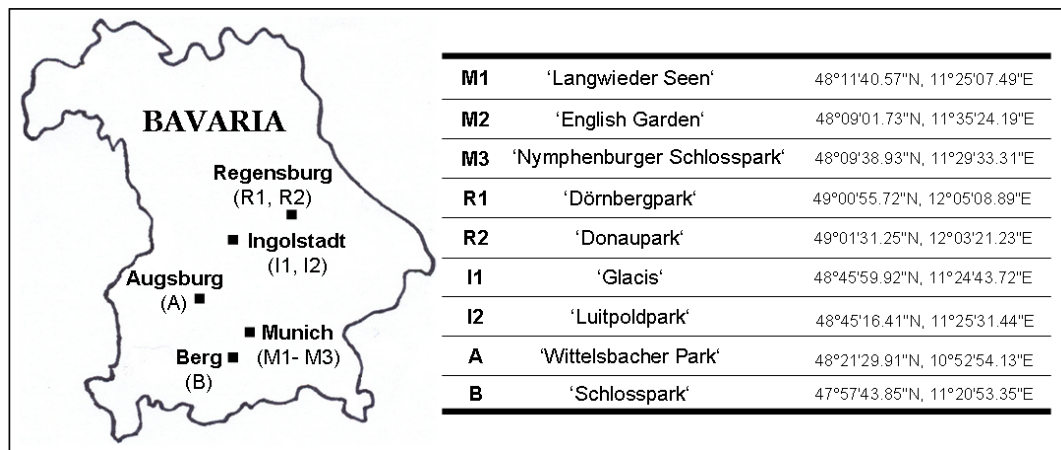


Fig. 1. Location of sampling sites

Tick sampling:

Questing ticks were sampled with the flagging method. Attached ticks were picked with tweezers and stored in 70% ethanol. Two separated collections were performed for each sampling, one for tick abundance (number of adult ticks and nymphs / 100m²) and additionally a second in order to obtain an appropriate sample size for the *A. phagocytophilum* prevalence study. To measure tick abundance an area of 2.5m length was investigated with a 1m²-sized flag on 40 different, representative locations within the sampling site. The aim of the *A. phagocytophilum* prevalence study was to collect 30 specimens of each adult female, adult male and nymph. Larvae were collected, but not included in this study.

In the laboratory, ticks were washed twice in distilled water, dried on a bleached pulp, identified to species level (Hillyard, 1996) and frozen at -20°C until further investigation.

DNA extraction:

Ticks were homogenized with a TissueLyser (Qiagen Hilden, Germany) in 80µl PBS-buffer with a 5mm steel bead. DNA-extraction was performed with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's tissue protocol with a modification in the elution step: Instead of one step à 200µl, two steps à 100 µl were carried out, to increase the efficiency of DNA extraction. In each

extraction a negative control was included to validate the extraction process. The quantitative and qualitative DNA concentration was measured spectrophotometrically (NanoDrop® ND-1000, PeqLab Erlangen, Germany).

PCR amplification:

To detect DNA of *A. phagocytophilum*, the samples were screened by real-time PCR, amplifying a 77-bp fragment of the *msp2* gene (Courtney et al., 2004). PCRs were performed in a reaction volume of 50µl, using 25µl of SYBR®-Green PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems Darmstadt, Germany), 1.5µl of each primer (ApMsp2f/ApMsp2r, 10µM) and 5.0µl template DNA in the AB-7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Cycling conditions for *msp2* real-time PCR started with an initial activation of 95.0°C for 10min, followed by 40 cycles of a denaturation step of 95.0°C for 15sec and an annealing-extension step of 60°C for 1min. Melting curve stages followed with 95.0°C for 15sec, 60.0°C for 1min, gradually increasing to 95.0°C for 30sec and 60.0°C for 15sec. Samples were considered positive with ct-values < 39.0 and a peak of fluorescence in melting curve analysis between 76.0 to 79.0°C. Five samples per sampling site were additionally investigated with a nested PCR, targeting a 497-bp fragment of the *16S rRNA* gene (Massung et al., 1998), to differentiate variants of *A. phagocytophilum*. Nested PCR was performed with the HotStarTaq DNA Polymerase Kit (Qiagen) in the Thermocycler Mastercycler® gradient (Eppendorf Hamburg, Germany) as previously described (Silaghi et al., 2011b). Amplified products were analysed in a 2% agarose gel, dyed with GelRed™ (Biotium Hayward, USA), and visualized under UV-light. PCR-clean water as negative control and *A. phagocytophilum*-positive tick samples as positive control were included in every PCR-run. PCR-products were purified with the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol and sent for sequencing with primer-pair ge9f/ge2 to Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). The results were analysed by ChromasLite® and aligned with ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Database searches and sequence comparisons were performed with the BLAST tool provided by the National Centre for Biotechnology (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Statistical analysis:

Statistical analysis relies on a logistic regression to estimate the effect of site, month, development stage and year on the probability of infection. To test the differences between gender, month and site a simultaneous test for general linear hypotheses based on multiple comparison of means with Tukey Contrasts were used (Hothorn et al., 2008). Additionally annual comparisons depending on gender, month and site were computed with chi-squared tests. $p < 0.05$ was regarded as significant. For the overall prevalences, a weighted estimator was calculated to take into account the 2-phase sampling scheme. The 95% confidence intervals for the overall prevalences were computed using a bootstrap technique (Davison and Hinkley, 1997). Furthermore, 95% Clopper-Pearson confidence intervals for binomial proportions (Clopper and Pearson, 1934) were used for the prevalences in each stratum. Statistical analyses were performed with R versions 2.10.1 (R Development Core Team, 2009) and 2.12.1 (R Development Core Team, 2010).

Results**Number of ticks and tick abundance:**

A total of 13,403 *I. ricinus* were collected in all sites throughout the 2-year study period. The average tick abundance (adult ticks and nymphs / 100m²) ranged between 15 and 53 ticks for 2009 and between 15 and 35 ticks for 2010, depending on sampling sites (Table 1).

Prevalence of *A. phagocytophilum* in *I. ricinus*:

A sample of 5,569 ticks was screened for the presence of *A. phagocytophilum*-DNA by real-time PCR. 500 ticks were regarded as positive. The weighted overall prevalence, taking into account the 2-phase sampling scheme, were 9.5% (95% CI 8.4-10.4%) for 2009 and 6.6% (95% CI 5.2-7.8%) for 2010. The annual variation in overall prevalence of *A. phagocytophilum* showed a statistically significant decrease ($p < 0.001$).

A. phagocytophilum were detected in 11.6% (95% CI 9.9-13.5%) and 8.5% (95% CI 6.4-11%) of adult females, 13.3% (95% CI 11.5-15.3%) and 9.2% (95% CI 6.9-12%) of adult males and 5% (95% CI 3.9-6.4%) and 3.9% (95% CI 2.6-5.6%)

of nymphs for 2009 and 2010, respectively. In both years, adults were significantly more often infected with *A. phagocytophilum* than nymphs ($p < 0.0001$).

In 2009, the sampling site M3 had a significantly lower prevalence than the sampling sites M2 and R1 ($p < 0.01$) as well as R2 ($p < 0.05$). In addition, I2 revealed a lower prevalence than the sampling sites M2 ($p < 0.05$) and R1 ($p < 0.05$). In 2010, only the site R1 had a significantly higher prevalence than the sampling sites M3 ($p < 0.001$), I1 ($p < 0.05$) and M2 ($p < 0.05$). The highest local prevalences were seen on the sampling sites M2 in 2009 and R1 in 2009 and 2010. In contrast, the lowest local prevalences in 2009 and 2010 were detected on sampling site M3. The annual comparison of each sampling site shows a decreasing tendency of *A. phagocytophilum* prevalence for all five sampling sites (Table 2).

The comparison of monthly prevalences of *A. phagocytophilum* between 2009 and 2010 showed no statistical significance, ranging from 9.2 to 14.1% and from 5.2 to 15.1% for adult females, from 11.0 to 18.9% and from 7.6 to 12.7% for adult males as well as from 2.7 to 9.6% and from 2.0 to 7.3% for nymphs, respectively (Table 3).

Table 1: Tick abundance (ticks/100m²) per site for 2009 and 2010

Site	Month**										Ø TA											
	May		June		July		August		September		2009	2010										
	2009	2010	2009	2010	2009	2010	2009	2010	2009	2010												
	Ad	Ny	Ad	Ny	Ad	Ny	Ad	Ny	Ad	Ny	Ad	Ny										
A*	36	6	--	--	18	18	--	--	4	1	--	--	1	1	--	--	17	--				
B	34	15	13	9	26	11	21	31	10	4	3	15	5	6	2	8	7	8	1	9	25	22
M1*	52	6	--	--	24	14	--	--	30	2	--	--	9	1	--	--	5	1	--	--	29	--
M2	33	11	11	6	27	25	15	26	18	8	14	38	27	14	5	13	15	14	3	10	38	28
M3	33	16	19	29	27	58	20	11	22	29	13	13	19	8	3	4	17	35	2	6	53	24
R1	29	2	20	5	47	14	37	40	13	3	20	29	7	4	6	9	2	5	1	10	25	35
R2*	24	0	--	--	20	10	--	--	3	3	--	--	1	3	--	--	1	8	--	--	15	--
I1	56	12	15	27	27	11	12	5	18	15	4	4	4	7	2	3	5	5	1	4	32	15
I2*	41	7	--	--	24	10	--	--	9	2	--	--	4	3	--	--	7	5	--	--	22	--
Ø	46	31	46	44	22	31	14	11	16	9												

* sampling sites A, M1, R2 and I2 were not investigated in 2010; ** tick density was not measured in April 2009

Ø TA: average tick abundance (adult ticks and nymphs/100m²); Ad.: adult ticks; Ny.: nymphs;

Table 2: Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks per site for 2009 and 2010

Site		Adult females			Adult males			Nymphs		
		no. pos/total no.	%	95%CI	no. pos/total no.	%	95%CI	no. pos/total	%	95%CI
A*	2009	15/88	17.0	9.9-26.6	7/78	9.0	3.7-17.6	4/83	4.8	1.3-11.9
	2010	--/--	--		--/--	--		--/--	--	
B	2009	8/121	6.6	2.9-12.6	12/114	10.5	5.6-17.7	10/141	7.1	3.5-12.7
	2010	4/88	4.5	1.3-11.2	12/74	16.2	8.7-26.6	4/150	2.7	0.7-6.7
M1*	2009	13/150	8.7	4.7-14.4	20/152	13.2	8.2-19.6	3/87	3.4	0.7-9.8
	2010	--/--	--		--/--	--		--/--	--	
M2	2009	26/180	14.4	9.7-20.4	33/164	20.1	14.3-27.1	12/156	7.7	4.0-13.1
	2010	13/131	9.9	5.4-16.4	11/136	8.1	4.1-14.0	4/150	2.7	0.7-6.7
M3	2009	12/150	8.0	4.2-13.6	8/150	5.3	2.3-10.2	4/150	2.7	0.7-6.7
	2010	7/141	5.0	2.0-10.0	6/131	4.6	1.7-9.7	2/150	1.3	0.2-4.7
R1	2009	22/126	17.5	11.3-25.2	27/137	19.7	13.4-27.4	7/129	5.4	2.2-10.9
	2010	19/123	15.4	9.6-23.1	15/115	13.0	7.5-20.6	14/150	9.3	5.2-15.2
R2*	2009	13/106	12.3	6.7-20.1	22/107	20.6	13.4-29.5	3/145	2.1	0.4-5.9
	2010	--/--	--		--/--	--		--/--	--	
I1	2009	22/161	13.7	8.8-20.0	18/167	10.8	6.5-16.5	11/156	7.1	3.6-12.3
	2010	7/106	6.6	2.7-13.1	7/97	7.2	3.0-14.3	5/142	3.5	1.2-8.0
I2*	2009	15/180	8.3	4.7-13.4	17/164	10.4	6.2-16.1	6/143	4.2	1.6-8.9
	2010	--/--	--		--/--	--		--/--	--	
Total	2009	146/1262	11.6	9.9-13.5	164/1233	13.3	11.5-15.3	60/1190	5.0	3.9-6.4
	2010	50/589	8.5	6.4-11.0	51/553	9.2	6.9-12.0	29/742	3.9	2.6-5.6

* sampling sites A, M1, R2 and I2 were not investigated in 2010

Table 3: Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks per month for 2009 and 2010

Month		Adult females			Adult males			Nymphs		
		no. pos/total	%	95%CI	no. pos/total	%	95%CI	no. pos/total	%	95%CI
April*	2009	16/157	10.2	5.9-16.0	23/173	13.3	8.6-19.3	4/85	4.7	1.3-11.6
	2010	--/--	--		--/--	--		--/--	--	
May	2009	38/270	14.1	10.2-18.8	38/270	14.1	10.2-	7/211	3.3	1.3-6.7
	2010	16/150	10.7	6.2-16.7	19/150	12.7	7.8-19.1	6/150	4.0	1.5-8.5
June	2009	24/262	9.2	6.0-13.3	37/269	13.8	9.9-18.5	7/261	2.7	1.1-5.5
	2010	11/150	7.3	3.7-12.7	12/150	8.0	4.2-13.6	11/150	7.3	3.7-12.7
July	2009	27/239	11.3	7.6-16.0	25/224	11.2	7.4-16.0	13/195	6.7	3.6-11.1
	2010	10/139	7.2	3.5-12.8	9/118	7.6	3.6-14.0	3/150	2.0	0.4-5.7
August	2009	25/205	12.2	8.1-17.5	21/191	11.0	6.9-16.3	22/228	9.6	6.2-14.2
	2010	5/97	5.2	1.7-11.6	7/90	7.8	3.2-15.4	6/142	4.2	1.6-9.0
September	2009	16/129	12.4	7.3-19.4	20/106	18.9	11.9-	7/210	3.3	1.4-6.8
	2010	8/53	15.1	6.8-27.6	4/45	8.9	2.5-21.2	3/150	2.0	0.4-5.7

* month April was not investigated in 2010

16S rRNA Gene:

Out of the 500 *msp2*-positive samples, five samples of each sampling site (n= 45) with ct-values between 14.8 and 29.8 were chosen for further investigations with nested PCR, targeting the *16S rRNA* gene, followed by sequencing. Alignment of the partial *16S rRNA* gene sequences revealed 6 different sequence variants with 99 to 100% identity to each other and five distinctions of nucleotide positions (Table 4).

Table 4: Single nucleotide substitutions in 497-bp sequence of *16S rRNA* gene of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* in German public parks compared with GenBank sequences

Sequence variant ^a	n	Sampling site	Nucleotide position ^b				
			3	11	97	172	303
'A' ^b	33	M1-M3, R1, R2, I1, I2 and A	A	G	C	A	A
'B' ^c	2	M3	A	G	C	A	G
'G' ^d	1	I1	A	G	C	G	A
'X' ^e	3	B	G	A	C	A	G
'Y' ^f	4	M3 and B	G	G	C	A	G
'Z' ^g	2	M2	A	G	T	A	A
<i>Ehrlichia</i> sp. 'Frankonia 2' (AF136712)			A	G	C	A	A
Prototype sequence of HGA agent (U02521)			A	G	C	A	G

^a no official nomenclature

^b GenBank accession no JF895438 - JF895445

^c GenBank accession no JF895447

^d GenBank accession no JF895449

^e GenBank accession no JF895448

^f GenBank accession no JF895450 and JF895451

^g GenBank accession no JF895446

^h in relation to the 497bp amplified in this study

33 sequences (variant 'A') showed 100% identity to GenBank sequence '*Ehrlichia* sp. 'Frankonia 2'' (Gen-Bank accession no. AF136712) and were found in all sampling sites with the exception of site B. Four sequences (variant 'Y') were 100% identical with the sequence of '*Ehrlichia* sp. 'Baden'' (Gen-Bank accession no. AF136714) and were detected in the sampling sites M3 and B. Three sequences (variant 'X'), with 100% identity to the GenBank sequence of '*Ehrlichia* sp. 'Frankonia 1'' (Gen-Bank accession no. AF136713) were detected only in sampling site B. Two sequences (variant 'Z') showed 100% identity to the

sequence of ‘*A. phagocytophilum* strain A8’ (Gen-Bank accession no. FJ538290) and another two sequences (variant ‘B’) to the prototype sequence of the HGA agent (Gen-Bank accession no. U02521). These two sequence types were exclusively found in sampling sites M2 and M3, respectively. One sequence type (variant ‘G’) had two nucleotide exchanges to the prototype sequence of the HGA agent (Gen-Bank accession no. U02521) and was different from all other partial *16S rRNA* sequences. It had no 100% match in the GenBank database. The description of the *16S rRNA* variants in this study (A, B, X, Y, Z, G) is not an official nomenclature and was also used in a previous study (Silaghi et al., 2011a).

14 exemplary sequences from this study were deposited in GenBank with the following accession nos.: JF895438 - JF895445 (variant ‘A’), JF895447 (variant ‘B’), JF895448 (variant ‘X’), JF895450 and JF895451 (variant ‘Y’), JF895446 (variant ‘Z’), JF895449 (variant ‘G’).

Table 5: *16S rRNA* gene variants of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* in German public parks with 100% homology to GenBank sequences with respective sources

Variant in this study	100% homology to existing sequences of <i>A. phagocytophilum</i>	
	Source*	exemplary accession nos.
‘A’	questing <i>I. ricinus</i> engorged <i>I. ricinus</i> (dog and hedgehogs) dogs cats 1 human patient	EU490522; AY281805; HQ629915 AF136712; FN390891 EU847533; FJ829761; GU236707 FJ515308; HM138366 GU236655
‘B’	prototype of HGA agent human patients horses dogs questing <i>I. ricinus</i> roe deer, red deer sheeps	U02521 GU236658 (Europe); GU236659 (USA) EU839852; AF482761; AF057707; U77389; GU236716 AF507941; U10873; FJ829787; EU847530 HQ629916; AJ242785; AF084907; AY281802 GU236579; FJ812389; FJ812388; EU839848; EU839850 GU236644; GU236625
‘G’	n.m.	
‘X’	roe deer questing <i>I. ricinus</i> engorged <i>I. ricinus</i> (roe deer) goats	FJ812405; EU839847; AF481854; AF384213; HQ629913; AJ242784 AF136713 FJ538288
‘Y’	roe deer mouflon questing <i>I. ricinus</i> engorged <i>I. ricinus</i> (roe deer) goats	FJ812408; GU236571; HM480385 FJ812409 AJ242783; HQ629914 AF136714 FJ538289
‘Z’	questing <i>I. ricinus</i> goats	EU490523 FJ538290

*sources, written in **bold**, mark the main incidence of the *A. phagocytophilum* variant
n.m.: no match with sequences in GenBank

Discussion

Our results confirm the hypothesis, that public parks may be a special focus of *A. phagocytophilum* in Germany (Silaghi et al., 2008). Local prevalences of sampling site M2 ('English Garden', Munich) in this study ranged between 8.1 and 20.1% for adult ticks and were comparable or even higher than those detected in previous studies (prevalences of 2.6%, 8.7% and 9.1%) (Fingerle et al., 1999; Leonhard, 2005; Silaghi et al., 2008). These findings also reveal a noticeable discrepancy to woodland areas in Southern Germany with prevalences of 0%, 1 to 3.9% and 1.6 to 5%, respectively (Fingerle et al., 1999; Leonhard, 2005; Silaghi et al., 2008). Other data on natural habitats in Germany show occurrence of *A. phagocytophilum* in *I. ricinus* with prevalences from 1 to 5.4% (Hartelt et al., 2004; Hildebrandt et al., 2010; Oehme et al., 2002). Beside of the 'English Garden in Munich (sampling site M2), we detected higher prevalences in seven other Bavarian city parks when compared to prevalences in previously investigated natural habitats in Germany. Furthermore, adult ticks were significantly more often infected than nymphs in this study. This confirms the results of previous studies (Grzeszczuk et al., 2004; Hildebrandt et al., 2002; Silaghi et al., 2008).

Our results on the prevalences of *A. phagocytophilum* in city parks were in agreement with other investigated European city parks. 9 to 24.4% of the ticks were infected in urban and suburban parks in Italy, Slovakia, Serbia and the Republic of Moldova as well as 14% of urban and suburban forests in Poland (Cinco et al., 1997; Derdákóvá et al., 2003; Koči et al., 2007; Milutinović et al., 2008; Stańczak et al., 2004). In comparison, city parks in Luxembourg and the Netherlands showed prevalences of 0.8% and 0% as well as no variations between the different habitat types in urban and woodland areas were recognized (Reye et al., 2010; Wielinga et al., 2006). This considerable geographical variation for *A. phagocytophilum* prevalence in ticks in Europe may be associated with interactions between tick density, different habitat types and the abundance of competent reservoir hosts.

In Europe, roe deer (*Capreolus capreolus*) is suggested to be the main reservoir for *A. phagocytophilum*, but also red deer (*Cervus elaphus*), wild boar (*Sus scrofa*), fox (*Vulpes vulpes*), small rodents, hedgehog (*Erinaceus europaeus*) and

birds, especially the blackbird (*Turdus merula*), are suspected (Alberdi et al., 2000; Franke et al., 2010; Hulínská et al., 2004; Liz et al., 2000; Petrovec et al., 2003; Skuballa et al., 2010; Stefanidesova et al., 2008). Ticks from the sampling site R1 ('Dörnbergpark') in this study show high prevalences over both investigated years, even though this is a small city park in the center of Regensburg and roe deer is missing. Consequently another reservoir than roe deer with a suitable ecological habitat in urban areas has to be taken into consideration. Potential reservoir hosts in urban areas could be: small rodents highly infected with *A. phagocytophilum* in Switzerland, the fox (*Vulpes vulpes*) with prevalences of 25% in Austria and the Czech Republic or the hedgehog (*Erinaceus europaeus*) with prevalences of 25.8% in Germany (Liz et al., 2000; Petrovec et al., 2003; Skuballa et al., 2010). But also domestic animals like dogs may serve as a suitable reservoir in urban areas or just as a dead end host. Urban dog owners frequently use public parks for their daily walks and seroprevalences of *A. phagocytophilum* up to 50.1% were detected in dogs from Germany (Barutzki et al., 2006; Jensen et al., 2007; Kohn et al., 2010). This shows that dogs in city areas may be at risk to come in contact with the pathogen causing canine granulocytic anaplasmosis. Further studies have to examine, if the dog density and the frequency of park visits are sufficient for maintaining the enzootic cycle of *A. phagocytophilum* in *I. ricinus*. Therefore dogs could have a potential reservoir function in cities, too.

In this study, six different variants of the partial *16S rRNA* gene of *A. phagocytophilum* were revealed. The incidence of these genetic variants and their sources in other European studies was consolidated in Table 5. The interesting fact is that big mammals like roe and red deer seem to be exclusively associated with the variants 'X' and 'Y' (of the *16S rRNA* variants found in this study) as well as with the prototype sequence of the HGA-agent (variant 'B') (Bown et al., 2009; Chen et al., 1994; Scharf et al., 2011; Silaghi et al., 2011a; Zeman and Pecha, 2008). These variants were only found in *I. ricinus* in this study at sampling sites M3 and B, which were in a more natural state than the other sampling sites and are generally known to contain a lot of wild game. At the remaining 7 sampling sites, where game do not or only rarely exist one strain (variant 'A') was almost exclusively present. Interestingly this strain is primarily associated with questing *I. ricinus* and dogs in other studies (Baumgarten et al.,

1999; Katargina et al., 2011; Kybicová et al., 2009; Scharf et al., 2011; Silaghi et al., 2008; von Loewenich et al., 2003). Another sequence type (variant 'Z') was only present in sampling site M2 ('English Garden'). This variant has previously only been found in *I. ricinus* from the same sampling area and in goats from Switzerland (Silaghi et al., 2008; Silaghi et al., 2011b). This may be an indication for the presence of this genetic variant of *A. phagocytophilum* in small ruminants, as in the northern part of the English Garden flocks of sheep are grazing in the summer time. These findings show that different variants of *A. phagocytophilum* were found in dissimilar habitats, suggesting a different host tropism. This interpretation conforms to results in previous studies. The *msp4* gene of *A. phagocytophilum* revealed different strains, which split in two clusters, one for ruminants and the other for human, horse and dog (de la Fuente et al., 2005) as well as the *p44/msp2* nucleotide sequence with a vector-, host- and geographical tropism (Milutinović et al., 2008) and the *ankA* gene, which clusters in 4 groups with host specificity for roe deer on the one hand and dog, human, horse and cats on the other (Scharf et al., 2011).

The high annual variation in overall prevalence of *A. phagocytophilum* of 9.5% in 2009 and 6.6% in 2010 in this study is comparable with results in other European countries. In Norway, a prevalence increase in five investigated sampling sites (average value: 4.7% to 11.8%) was shown in a 2-year-survey (Rosef et al., 2009) as well as a high variability of focal prevalences in Poland (such as 15.9%, 50%, 2.5% to 22.7% for one sampling site) in a 4-year-survey (Grzeszczuk and Stańczak, 2006). These unequal annual occurrences of *A. phagocytophilum* may result from various biotic and abiotic factors. Suggested explanations are the only temporarily lasting infection with *A. phagocytophilum* of some small rodents, like white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*), or the different transmission dynamic of pathogens in coinfecting ticks (Levin and Fish, 2001; Stafford et al., 1999). But also climate changes may have an impact on tick-borne pathogens (Gray et al., 2009). In Germany, during an 8-year-survey on HGA-seroprevalence in human patients, no serologically positive case was detected after an extremely cold winter in 1996, whereas a seroprevalence of 14% was detected after a relatively mild winter in 1998 (Kowalski et al., 2006). In the present study, sampling in 2010 showed a significant decrease in overall prevalence of *A. phagocytophilum*

in comparison to 2009. The winter 2009/2010 had 51 days of full snow layer, which were 16 days more than during winter 2008/2009. Furthermore, more rainfall was registered (66.5mm in 2009 and 93.4mm in 2010) during the sampling period from May to August (data supplied from the German Weather Service). It has been demonstrated that climatic parameters like the severity of winter or the amount of rainfall during the activity season have an effect on tick populations in the ensuing summer as well as on host/reservoir populations, thus on the risk of tick exposure and potential pathogen transmission (Daniel et al., 2008; Knap et al., 2009; Süss et al., 2008).

Local prevalence variations between the sampling sites were also recognized in this study. Especially sampling site M3 ('Nymphenburger Schlosspark') showed a significantly lower prevalence than the sampling sites M2 ('English Garden') and R1 ('Dörnbergpark'). This may depend on the individual structure of the sampling areas. Sampling site M3 is in a more natural state than sampling site M2 or R1 and harbors a lot of different wild animals. In contrast, M2 and R1 are thoroughly horticulturally maintained and influenced by human beings. Therefore, a decrease of biodiversity of animals living in public parks is expected in comparison to areas in more natural state. Keesing et al. (2010) declared that a decrease in biodiversity may entail an increase of transmission of tick-borne pathogens.

In 2009, the sampling site M3 showed a 'very high' tick abundance and the remaining sampling sites a 'medium' tick abundance according to Schwarz et al. (2009). In 2010, all sampling areas revealed 'medium' tick abundance, including M3. Thus, only sampling site M3 shows an annual decrease of tick abundance from 2009 to 2010. With regard to the decrease of overall *A. phagocytophilum* prevalence from 2009 to 2010, no direct correlation can be made between the occurrence of the pathogen and the tick abundance in this study, even though tick abundance influences the probability of encountering a competent host and thereby the pathogen transmission to the host or the vector.

Previous studies revealed 'low' and 'medium' tick abundance in city parks in Luxembourg and the Netherlands, respectively, as well as 'low' to 'medium' tick abundance in German woodland areas and 'medium' to 'very high' tick abundance in a large part of the 'Siebengebirge' in North Rhine-Westphalia, Germany (Kupča, 2009; Reye et al., 2010; Schwarz et al., 2009; Wielinga et al.,

2006). These results show that the tick abundances in Bavarian city parks are comparable or even higher than in other European urban areas and that the tick abundance in Germany varies in a wide range depending on different habitat types. However, these data have to be interpreted with caution, because they show only a ‘snap shot’ of tick abundance in the investigated area at the time of the sampling dependent on study design and method used. But bearing in mind that tick sampling was performed in this study only on not rainy days with a temperature $>7^{\circ}\text{C}$, the average tick abundance approximated the prospective tick abundance, visitors of public parks have to deal with, when they use these areas for recreational activities on days with good weather.

In conclusion, the infection rates of *I. ricinus* with *A. phagocytophilum* in the Bavarian public parks, investigated in this study, were the highest ones ever recorded in Germany. The annual prevalence variability in *I. ricinus* and the interesting genetic variation of the *16S rRNA* gene of *A. phagocytophilum* with regard to the geographic location clearly demonstrate that varied factors, like abundance of competent vectors and reservoir hosts, tick density, biotope and climatic parameters, may influence the occurrence of *A. phagocytophilum* in ticks and therefore the risk of pathogen transmission to animals and humans. Thus, our results add some extraordinary aspects to the current state of knowledge regarding the enzootic life-cycle of *A. phagocytophilum* in *I. ricinus* ticks in Germany.

Acknowledgements

We would like to thank Michael Höhle for providing us his R-code and Tim Tiedemann for assistance in laboratory work.

This project is part of the research project VICCI (Vector-borne Infectious Diseases in Climate Change Investigation) and thus co-funded by the Bavarian State Ministry of the Environment and Public Health (Grant-No. K1 08–18 module 4).

References

- Alberdi, M.P., Walker, A.R., Urquhart, K.A., 2000. Field evidence that roe deer (*Capreolus capreolus*) are a natural host for *Ehrlichia phagocytophila*. *Epidemiol. Infect.* 124, 315-323.

- Barutzki, D., De Nicola, A., Zeziola, M., Reule, M., 2006. Seroprävalenz der *Anaplasma phagocytophilum*-Infektion bei Hunden in Deutschland. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 119, 342-347.
- Baumgarten, B.U., Röllinghoff, M., Bogdan, C., 1999. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks from southern Germany. J. Clin. Microbiol. 37, 3448-3451.
- Bown, K.J., Lambin, X., Ogden, N.H., Begon, M., Telford, G., Woldehiwet, Z., Birtles, R.J., 2009. Delineating *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in coexisting, discrete enzootic cycles. Emerg. Infect. Dis. 15, 1948-1954.
- Chen, S.M., Dumler, J.S., Bakken, J.S., Walker, D.H., 1994. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. J. Clin. Microbiol. 32, 589-595.
- Cinco, M., Padovan, D., Murgia, R., Maroli, M., Frusteri, L., Heldtander, M., Johansson, K.E., Engvall, E.O., 1997. Coexistence of *Ehrlichia phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Italy as determined by *16S rRNA* gene sequencing. J. Clin. Microbiol. 35, 3365-3366.
- Clopper, C., Pearson, E., 1934. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. Biometrika 26, 404-413.
- Comer, J.A., Paddock, C.D., Childs, J.E., 2001. Urban zoonoses caused by *Bartonella*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, and *Rickettsia* species. Vector Borne Zoonotic Dis. 1, 91-118.
- Courtney, J.W., Kostelnik, L.M., Zeidner, N.S., Massung, R.F., 2004. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 42, 3164-3168.
- Daniel, M., Kříz, B., Valter, J., Kott, I., Danielová, V., 2008. The influence of meteorological conditions of the preceding winter on the incidences of tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in the Czech Republic. Int. J. Med. Microbiol. 298, 60-67.
- Davison, A., Hinkley, D., 1997. Bootstrap Methods and Their Applications. Cambridge University Press, Cambridge.

- de la Fuente, J., Massung, R.F., Wong, S.J., Chu, F.K., Lutz, H., Meli, M., von Loewenich, F.D., Grzeszczuk, A., Torina, A., Caracappa, S., Mangold, A.J., Naranjo, V., Stuen, S., Kocan, K.M., 2005. Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1309-1317.
- Derdáková, M., Halánová, M., Stanko, M., Štefančíková, A., Čisláková, L., Pet'ko, B., 2003. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from eastern Slovakia. *Ann. Agric. Environ. Med.* 10, 269-271.
- Doudier, B., Olano, J., Parola, P., Brouqui, P., 2010. Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* spp. as human pathogens. *Vet. Parasitol.* 167, 149-154.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2145-2165.
- Fingerle, V., Goodman, J.L., Johnson, R.C., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., Wilske, B., 1997. Human granulocytic ehrlichiosis in southern Germany: increased seroprevalence in high-risk groups. *J. Clin. Microbiol.* 35, 3244-3247.
- Fingerle, V., Munderloh, U.G., Liegl, G., Wilske, B., 1999. Coexistence of ehrlichiae of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. *Med. Microbiol. Immunol.* 188, 145-149.
- Franke, J., Meier, F., Moldenhauer, A., Straube, E., Dorn, W., Hildebrandt, A., 2010. Established and emerging pathogens in *Ixodes ricinus* ticks collected from birds on a conservation island in the Baltic Sea. *Med. Vet. Entomol.* 24, 425-432.
- Gray, J.S., Dautel, H., Estrada-Peña, A., Kahl, O., Lindgren, E., 2009. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdiscip.*

- Perspect. Infect. Dis. 2009, Article ID 593232.
- Grzeszczuk, A., Stańczak, J., 2006. Highly variable year-to-year prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in northeastern Poland: a 4-year follow-up. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1078, 309-311.
- Grzeszczuk, A., Stańczak, J., Kubica-Biernat, B., Racewicz, M., Kruminis-Łozowska, W., Prokopowicz, D., 2004. Human anaplasmosis in north-eastern Poland: seroprevalence in humans and prevalence in *Ixodes ricinus* ticks. Ann. Agric. Environ. Med. 11, 99-103.
- Hartelt, K., Oehme, R., Frank, H., Brockmann, S.O., Hassler, D., Kimmig, P., 2004. Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. Int. J. Med. Microbiol. 293 Suppl 37, 86-92.
- Hildebrandt, A., Krämer, A., Sachse, S., Straube, E., 2010. Detection of *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia). Ticks Tick-borne Dis. 1, 52-56.
- Hildebrandt, A., Schmidt, K.H., Fingerle, V., Wilske, B., Straube, E., 2002. Prevalence of granulocytic Ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany (Thuringia) detected by PCR and sequencing of a 16S ribosomal DNA fragment. FEMS Microbiol. Lett. 211, 225-230.
- Hillyard, P.D., 1996. Ticks of North-West Europe, Synopses of the British Fauna No. 52. The Linnean Society of London, London.
- Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P., 2008. Simultaneous Inference in General Parametric Models. Biom. J. 50, 346-363.
- Hulínská, D., Langrová, K., Pejčoch, M., Pavlásek, I., 2004. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in animals by real-time polymerase chain reaction. APMIS 112, 239-247.
- Jensen, J., Simon, D., Murua Escobar, H., Soller, J.T., Bullerdiek, J., Beelitz, P., Pfister, K., Nolte, I., 2007. *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. Zoonoses Public Health 54, 94-101.
- Junttila, J., Peltomaa, M., Soini, H., Marjamäki, M., Viljanen, M.K., 1999.

- Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in urban recreational areas of Helsinki. J. Clin. Microbiol. 37, 1361-1365.
- Katargina, O., Geller, J., Alekseev, A., Dubinina, H., Efremova, G., Mishaeva, N., Vasilenko, V., Kuznetsova, T., Järvekülg, L., Vene, S., Lundkvist, A., Golovljova, I., 2011. Identification of *Anaplasma phagocytophilum* in tick populations in Estonia, European Part of Russia and Belarus. Clin. Microbiol. Infect. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03457.
- Keesing, F., Belden, L.K., Daszak, P., Dobson, A., Harvell, C.D., Holt, R.D., Hudson, P., Jolles, A., Jones, K.E., Mitchell, C.E., Myers, S.S., Bogich, T., Ostfeld, R.S., 2010. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. Nature 468, 647-652.
- Knap, N., Durmiši, E., Saksida, A., Korva, M., Petrovec, M., Avšič-Županc, T., 2009. Influence of climatic factors on dynamics of questing *Ixodes ricinus* ticks in Slovenia. Vet. Parasitol. 164, 275-281.
- Koči, J., Movila, A., Taragel'ová, V., Toderas, I., Uspenskaia, I., Derdáková, M., Labuda, M., 2007. First report of *Anaplasma phagocytophilum* and its co-infections with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) from Republic of Moldova. Exp. Appl. Acarol. 41, 147-152.
- Kohn, B., Silaghi, C., Galke, D., Arndt, G., Pfister, K., 2010. Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. Res. Vet. Sci. 91, 71-76.
- Kowalski, J., Hopfenmüller, W., Fingerle, V., Malberg, H., Eisenblätter, M., Wagner, J., Miksits, K., Hahn, H., Ignatius, R., 2006. Seroprevalence of human granulocytic anaplasmosis in Berlin/Brandenburg, Germany: an 8-year survey. Clin. Microbiol. Infect. 12, 924-927.
- Kupča, A., 2009. *Ixodes ricinus* (Ixodidae): Saisonale Aktivität und natürliche Infektionen mit dem FSME-Virus an ausgewählten Standorten in Bayern. doctoral thesis. Ludwig-Maximilians-University, Munich.
- Kybicová, K., Schánilec, P., Hulínská, D., Uherková, L., Kurzová, Z., Spejchalová, S., 2009. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs in the Czech Republic. Vector Borne Zoonotic Dis. 9, 655-661.

- Leonhard, S., 2005. Untersuchungen zur Häufigkeit von *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* und *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* aus Bayern und Baden-Württemberg. doctoral thesis. Ludwig-Maximilians-University, Munich.
- Levin, M.L., Fish, D., 2001. Interference between the agents of Lyme disease and human granulocytic ehrlichiosis in a natural reservoir host. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 1, 139-148.
- Liz, J.S., Anderes, L., Sumner, J.W., Massung, R.F., Gern, L., Rutti, B., Brossard, M., 2000. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1002-1007.
- Massung, R.F., Slater, K., Owens, J.H., Nicholson, W.L., Mather, T.N., Solberg, V.B., Olson, J.G., 1998. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1090-1095.
- Milutinović, M., Masuzawa, T., Tomanović, S., Radulović, Z., Fukui, T., Okamoto, Y., 2008. *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* and their co-infections in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks collected in Serbia. *Exp. Appl. Acarol.* 45, 171-183.
- Oehme, R., Hartelt, K., Backe, H., Brockmann, S., Kimmig, P., 2002. Foci of tick-borne diseases in southwest Germany. *Int. J. Med. Microbiol.* 291 Suppl 33, 22-29.
- Ogden, N.H., Bown, K., Horrocks, B.K., Woldehiwet, Z., Bennett, M., 1998. Granulocytic *Ehrlichia* infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. *Med. Vet. Entomol.* 12, 423-429.
- Petrovec, M., Lotric Furlan, S., Zupanc, T.A., Strle, F., Brouqui, P., Roux, V., Dumler, J.S., 1997. Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1556-1559.
- Petrovec, M., Sixl, W., Schweiger, R., Mikulašek, S., Elke, L., Wüst, G., Marth, E., Strašek, K., Stünzner, D., Avšič-Županc, T., 2003. Infections of wild animals with *Anaplasma phagocytophila* in Austria and the Czech Republic. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990, 103-106.

- Reye, A.L., Hübschen, J.M., Sausy, A., Muller, C.P., 2010. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2923-2931.
- Rosef, O., Radzijeuskaja, J., Paulauskas, A., Haslekås, C., 2009. The prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Norway. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 43-45.
- Scharf, W., Schauer, S., Freyburger, F., Petrovec, M., Schaarschmidt-Kiener, D., Liebisch, G., Runge, M., Ganter, M., Kehl, A., Dumler, J.S., Garcia-Perez, A.L., Jensen, J., Fingerle, V., Meli, M.L., Ensser, A., Stuen, S., von Loewenich, F.D., 2011. Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum ankA* gene clusters. *J. Clin. Microbiol.* 49, 790-796.
- Schwarz, A., Maier, W.A., Kistemann, T., Kampen, H., 2009. Analysis of the distribution of the tick *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae) in a nature reserve of western Germany using Geographic Information Systems. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 212, 87-96.
- Silaghi, C., Gilles, J., Höhle, M., Fingerle, V., Just, F.T., Pfister, K., 2008. *Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 972-974.
- Silaghi, C., Hamel, D., Thiel, C., Pfister, K., Passos, L.M., Rehbein, S., 2011a. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in wild caprine and cervid ungulates from the Alps in Tyrol, Austria. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 355-362.
- Silaghi, C., Scheuerle, M., Friche Passos, L., Thiel, C., Pfister, K., 2011b. PCR detection of *Anaplasma phagocytophilum* in goat flocks in an area endemic for tick-borne fever in Switzerland. *Parasite* 18, 57-62.
- Skuballa, J., Petney, T., Pfäffle, M., Taraschewski, H., 2010. Molecular Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in the European Hedgehog (*Erinaceus europaeus*) and its Ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10, 1055-1057.
- Stafford, K.C., 3rd, Massung, R.F., Magnarelli, L.A., Ijdo, J.W., Anderson, J.F., 1999. Infection with agents of human granulocytic ehrlichiosis, lyme disease, and babesiosis in wild white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) in

- Connecticut. J. Clin. Microbiol. 37, 2887-2892.
- Stańczak, J., Gabre, R.M., Kruminis-Łozowska, W., Racewicz, M., Kubica-Biernat, B., 2004. *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. Ann. Agric. Environ. Med. 11, 109-114.
- Stefanidesova, K., Kocianova, E., Boldis, V., Kostanova, Z., Kanka, P., Nemethova, D., Spitalska, E., 2008. Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* infection in free-ranging ungulates in central Slovakia. Eur. J. Wildl. Res. 54, 519-524.
- Süss, J., Klaus, C., Gerstengarbe, F.W., Werner, P.C., 2008. What makes ticks tick? Climate change, ticks, and tick-borne diseases. J. Travel Med. 15, 39-45.
- von Loewenich, F.D., Baumgarten, B.U., Schröppel, K., Geissdörfer, W., Röllinghoff, M., Bogdan, C., 2003. High diversity of ankA sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. J. Clin. Microbiol. 41, 5033-5040.
- Wielinga, P.R., Gaasenbeek, C., Fonville, M., de Boer, A., de Vries, A., Dimmers, W., Akkerhuis Op Jagers, G., Schouls, L.M., Borgsteede, F., van der Giessen, J.W., 2006. Longitudinal analysis of tick densities and *Borrelia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* infections of *Ixodes ricinus* ticks in different habitat areas in The Netherlands. Appl. Environ. Microbiol. 72, 7594-7601.
- Woldehiwet, Z., 2010. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. Vet. Parasitol. 167, 108-122.
- Zeman, P., Pecha, M., 2008. Segregation of genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* circulating among wild ruminants within a Bohemian forest (Czech Republic). Int. J. Med. Microbiol. 298, 203-210.

4.4.2 Publikation 2

Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany

Sabine Schorn¹, Kurt Pfister¹, Holger Reulen², Monia Mahling², Cornelia Silaghi¹

Parasites & Vectors (2011) 4:135

¹Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

²Statistical Consulting Unit, Department of Statistics, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany

Sabine Schorn^{1§}, Kurt Pfister¹, Holger Reulen², Monia Mahling², and Cornelia Silaghi¹

¹ Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

² Statistical Consulting Unit, Department of Statistics, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

§Corresponding author

Email addresses:

SS: sabine.schorn@tropa.vetmed.uni-muenchen.de

KP: kurt.pfister@tropa.vetmed.uni-muenchen.de

HR: Holger.Reulen@campus.lmu.de

MM: Monia.Mahling@stat.uni-muenchen.de

CS: cornelia.silaghi@tropa.vetmed.uni-muenchen.de

Abstract

Background

Only limited information is available about the occurrence of ticks and tick-borne pathogens in public parks, which are areas strongly influenced by human beings. For this reason, *Ixodes ricinus* were collected in public parks of different Bavarian cities in a 2-year survey (2009 and 2010) and screened for DNA of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. by PCR. Species identification was performed by sequence analysis and alignment with existing sequences in GenBank. Additionally, coinfections with *Anaplasma phagocytophilum* were investigated.

Results

The following prevalences were detected: *Babesia* spp.: 0.4% (n= 17, including one pool of two larvae) in 2009 and 0.5 to 0.7% (n= 11, including one pool of five larvae) in 2010; *Rickettsia* spp.: 6.4 to 7.7% (n= 285, including 16 pools of 76 larvae) in 2009. DNA of *Bartonella* spp. in *I. ricinus* in Bavarian public parks could not be identified. Sequence analysis revealed the following species: *Babesia* sp. EU1 (n= 25), *B. divergens* (n= 1), *B. divergens/capreoli* (n= 1), *B. gibsoni*-like (n= 1), *R. helvetica* (n= 272), *R. monacensis* IrR/Munich (n= 12) and unspecified *R. monacensis* (n= 1). The majority of coinfections were *R. helvetica* with *A. phagocytophilum* (n= 27), but coinfections between *Babesia* spp. and *A. phagocytophilum*, or *Babesia* spp. and *R. helvetica* were also detected.

Conclusions

I. ricinus ticks in urban areas of Germany harbor several tick-borne pathogens and coinfections were also observed. Public parks are of particularly great interest regarding the epidemiology of tick-borne pathogens, because of differences in both the prevalence of pathogens in ticks as well as a varying species arrangement when compared to woodland areas. The record of DNA of a *Babesia gibsoni*-like pathogen detected in *I. ricinus* suggests that *I. ricinus* may harbor and transmit more *Babesia* spp. than previously known. Because of their high recreational value for human beings, urban green areas are likely to remain in the research focus on public health issues.

Background

Ixodes (I.) ricinus, the most common tick species in Europe, serves as an important vector for several microbial pathogens. Beside *Borrelia burgdorferi sensu lato* and the tick-borne encephalitis virus, other pathogens such as *Babesia (B.)* spp., Spotted Fever Group (SFG) Rickettsiae, *Anaplasma (A.) phagocytophilum*, and *Bartonella* spp. are of increasing public health interest [1].

Babesia spp., protozoans of the phylum Apicomplexa, have been well known pathogens in veterinary medicine since the 19th century and cause babesiosis in domestic animals [2]. Human babesiosis, primarily caused by *B. microti* in the USA and by *B. divergens* in Europe, was first documented in 1957 in former Yugoslavia. Since then, several hundred clinical cases in the USA and about 40 clinical cases in Europe have been recorded. However, in Europe it occurs almost exclusively in splenectomized or otherwise immunosuppressed patients [3, 4]. Symptoms are flu-like (high fever, malaise, chills, myalgia, anemia, fatigue, nausea, vomiting and diarrhoea) and the course of disease can range from mild to fatal [5]. Beside *B. microti* and *B. divergens*, clinical cases of human babesiosis caused by *B. duncani* n. sp. and a *B. divergens*-like pathogen in the USA, and by *Babesia* sp. EU1 (*B. venatorum*) in Europe have been noticed in the last 15 years [6-9]. Infections due to *B. microti* seem less acute than with *B. divergens* and infections with *Babesia* sp. EU1 are generally milder [5, 10]. In previous investigations of *I. ricinus* in several European countries the species *B. divergens*, *B. microti* and *Babesia* sp. EU1 have been detected [11-18]. Prevalences in ticks range from 0.6 to 51.04% [19, 20].

Pathogens of the class α -Proteobacteria, like *A. phagocytophilum* and certain SFG Rickettsiae, represent a potential risk for human health. *A. phagocytophilum* is the etiological agent of human granulocytic anaplasmosis (HGA), a febrile illness with malaise, myalgia and headache [21]. In the USA, HGA has an increasing incidence since the first documented clinical case in 1994, with about 1,000 cases reported to the CDC in 2008 (<http://www.cdc.gov/anaplasmosis>) [22]. In comparison, about 70 clinical cases have been documented in Europe until now [23]. *A. phagocytophilum* prevalences of 0.25 to 24.4% are found in *I. ricinus* in various European countries [24, 25]. Furthermore, nine different *Rickettsia (R.)*

spp., belonging to the SFG and able to cause rickettsiosis in humans, are detectable in Europe [26]. Of these, three pathogens (*R. helvetica*, *R. monacensis* and *R. massiliae*) have been detected in *I. ricinus* with prevalences from 1.7 to 31.3% [27-32]. Symptoms of SFG rickettsiosis generally include fever, headache, muscle pain, rash, local lymphadenopathy and inoculation eschar [33]. In addition, *R. helvetica* has been detected in two patients with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death as well as attributed to one case of meningitis and eight cases with mild symptoms (fever, headache and myalgia) [34-37].

The transmission of *Bartonella* spp. by ticks, including *Bartonella henselae* as the etiological agent of cat scratch diseases, is discussed, but has so far not been fully proven [38-40]. DNA of *Bartonella henselae*, *Bartonella schoenbuchensis*-like, *Bartonella capreoli* and unspecified *Bartonella* spp. has been detected in *I. ricinus*. Prevalences varied in a wide range from 0.2 to 60% in ticks, collected from humans, dogs, deer and directly from vegetation. However, reports in Europe are very rare and data from Germany are missing to date [16, 41-47].

Urban areas, especially public parks, seem to be different from woodland areas regarding the occurrence of tick-borne pathogens [48, 49]. However, in European urban areas epidemiological studies on simultaneous detection of various tick-borne pathogens are rare [16, 50, 51]. Therefore, the aim of the study was to investigate *I. ricinus* for the occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp., and coinfections with *A. phagocytophilum*, with a special focus on urban sites. Selected Bavarian public parks, highly frequented by daily visitors and used for recreational activities, were investigated in this 2-year survey as a contribution to the current state of knowledge on the epidemiology of tick-borne pathogens in Germany.

Methods

Sampling sites and tick collection

In 2009, nine different public parks in five Bavarian cities (Munich, Regensburg, Ingolstadt, Augsburg and Berg at the Lake Starnberg) were investigated (Figure 1). Additionally five selected sites were investigated for a second year in 2010. Seven sampling sites (M2, M3, R1, R2, I1, I2 and A) were intra-urban city parks

and two sites (M1 and B) were heavily frequented suburban recreational areas in the respective cities. The vegetation of all sampling sites consists predominantly of deciduous trees, bushes and groomed lawns (with the exception of sampling area B). By comparison, two sampling sites (M3 and B) were left in a more natural state with a higher density of trees and thick and leafy undergrowth. Questing ticks were collected monthly from the vegetation (April to September 2009 and May to September 2010) by flagging and stored in 70% ethanol.

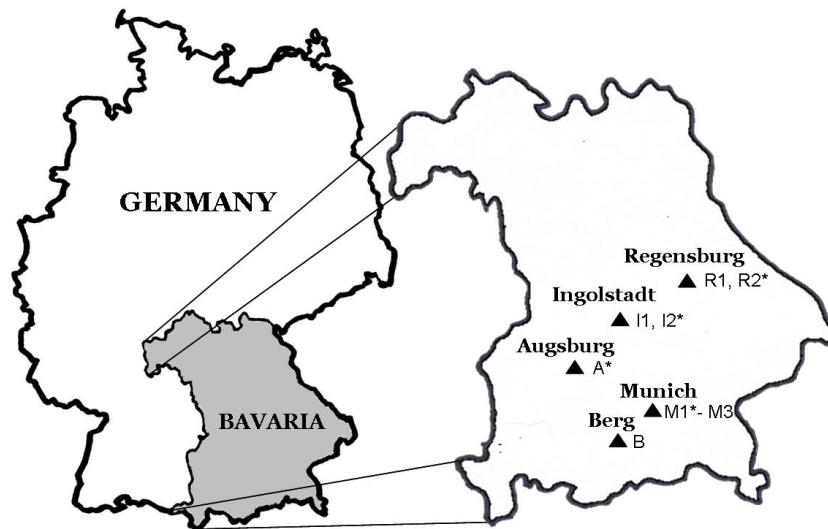


Figure 1: Sampling sites. Sites marked with * were only investigated 2009

DNA extraction

In the laboratory, ticks were identified to species level [52], after they were washed twice with distilled water and dried on a bleached pulp. Adult ticks and nymphs were handled individually and larvae in pools of up to five specimens. After the ticks were homogenized in 80µl PBS-buffer with a 5-mm steel bead in the TissueLyser (Qiagen Hilden, Germany), DNA was extracted according to the manufacturer's tissue protocol (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) in two elution steps of à 100µl for the best quantitative DNA result. Quantitative and qualitative evaluation of DNA extraction was carried out spectrophotometrically with the NanoDrop® ND-1000 system (PeqLab Erlangen, Germany).

Molecular detection of the pathogens

In 2009, ticks from all nine sampling sites were screened for DNA of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum* and *Bartonella* spp., whereas samples from the five sites in 2010 were screened for DNA of *Babesia* spp. and *A. phagocytophilum*. Conventional PCRs with previously published primers were used for the detection of DNA of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. (Table 1), followed by gel electrophoresis (2% Agarosegel, dyed with GelRed™ (Biotium)) [12, 53-55]. The HotStarTaqPlus DNA Polymerase Kit (Qiagen, Germany) was used for molecular detection of *Babesia* spp. and *Bartonella* spp. as well as the Expand High Fidelity plus PCR System (Roche, Germany) for *Rickettsia* spp., each according to the manufacturer's protocol with a reaction volume of 50µl, including 5.0µl template DNA. PCRs were performed in the Thermocycler Mastercycler® gradient (Eppendorf, Germany) and in every run a positive control [DNA of (i) *B. divergens* (cattle) and *B. microti* (BALB/c mice); (ii) *R. helvetica* (ticks); (iii) *Bartonella henselae* (fleas)] and PCR-clean water as a negative control were included. Detection of DNA of *A. phagocytophilum* was performed with a SYBR®-Green real-time PCR with primers published by Courtney et al. [56]. Detailed description of the method will be published in a separate manuscript [Schorn et al. unpublished]. For *A. phagocytophilum*, larvae were not included in the study.

Positive PCR products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol and sent for sequencing to Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). Sequencing was performed with one primer for *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. and with both primers for *Babesia* spp. Results were analysed by ChromasLite® and for *Babesia* spp. alignment was performed with ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Database searches and sequence comparisons were performed with BLAST tool provided by the National Center for Biotechnology (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Samples regarded as *R. monacensis* and unspecified *Rickettsia* spp. in the investigated part of the *gltA*-gene were further analysed with a PCR, targeting the *ompB*-gene for more detailed specification (Table 1).

Table 1: PCR conditions and primers used for the detection of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp.

pathogen	primer	gene (bp)	ref.	final primer conc.	Ds	As	Es	cycles
<i>Babesia</i> spp.	BJ1 5'-GTCTTGTTAATTGGAATGATGG-3'	<i>18S rRNA</i>	[12]	1 μ M	94°C 30s	55°C 30s	72°C 40s	40
	BN2 5'-TAGTTATGGTTAGGACTACG-3'	(411-452)						
<i>Rickettsia</i> spp.	RpCS.877p 5'-GGGGGCGCTGCTCACGGCGG-3'	<i>gIIA</i> (380)	[54]	0,5 μ M	95°C 20s	48°C 30s	60°C 2min	35
	RpCS.1258n 5'-ATTGCAAAAAAGTACAGTGAACA-3'							
	120-2788 5'-AAACAATAATCAAGGTACTGT-3'	<i>ompB</i> (765)	[51]	0,5 μ M	95°C 30s	50°C 30s	68°C 90s	40
<i>Bartonella</i> spp.	BA325s 5'-CTTCAGATGATGATCCCAAGCCTTCTGGCG-3'	<i>16S-23S rRNA</i>	[53]	1 μ M	94°C 30s	66°C 30s	72°C 50s	40
	BA1100as 5'-GAAACCGAGCACCCTGCTTGCAGCAAGCA-3'	(ITS) (420-780)						

Ds: denaturation step; As: annealing step; Es: elongation step

Statistical analysis

Logistic regression was used for statistical analysis to estimate the effect of site, month, development stage and year on the probability of infection. Logistic regression was performed accepting the minimum prevalence (in a positive pool of larvae, one specimen is assumed as positive). The variables ‘April’, ‘September’ and sampling site ‘A’ were removed for the statistical analysis of *Babesia* spp., because no infections of ticks were seen in these months or this sampling site and therefore the estimation of the parameters was not possible. Differences between gender, month and site were computed with a simultaneous test for general linear hypotheses based on multiple comparison of means with Tukey Contrasts [57]. $p < 0.05$ was regarded as significant. Statistical analysis was performed with R version 2.12.1 (R Development Core Team, 2010).

Results

Collection of ticks

A total of 9,107 and 4,296 *I. ricinus* were collected in 2009 and 2010, respectively.

Molecular detection of *Babesia* spp.

A total of 6,593 (2009: $n = 4,459$ and 2010: $n = 2,134$) ticks were screened for the presence of DNA of *Babesia* spp. The overall prevalences were 0.4% ($n = 17$, including 1 pool of 2 larvae) for 2009 and 0.5 to 0.7% ($n = 11$, including 1 pool of 5 larvae) for 2010 (Table 2). With regard to differences in infection there was no statistical significance of developmental stages, investigated months or sampling sites.

GenBank analysis of the *Babesia* spp. positive samples ($n = 28$) revealed 25 samples with a 447bp sized sequence, 100% homologous to sequences of *Babesia* sp. EU1 from *I. ricinus*, roe deer and human patients from several European countries [GenBank: GQ856650, GU647159, FJ215873, EF185818 and AY046575]. One more positive sample showed 100% identity to a sequence of *B. capreoli* from roe deer in France [GenBank: FJ944828] and also to a sequence of *B. divergens* from reindeer in the UK [GenBank: AY098643]. The sequence was not discriminating enough to allow a clear species identification. One sequence

was 100% homologous to several sequences of *B. divergens* in cattle, human patient and *I. ricinus* [GenBank: FJ944826, FJ944823, AY789076, AY648876, AY648871]. However, only 303 bp of this sequence could be evaluated. The last sequence (445bp) was 100% identical to *B. gibsoni* isolates from Asia and the USA [GenBank: AF271082, AF271081] as well as from a dog in Spain [GenBank: AY278443]. Sequences from *Babesia* sp. EU1, *B. divergens* and *B. gibsoni*-like were deposited in GenBank with the following accession nos.: *Babesia* sp. EU1: [GenBank: JN036420-JN036426], *B. divergens*: [GenBank: JN036427], *B. gibsoni*-like: [GenBank: JN036428].

Molecular detection of *Rickettsia* spp.

4,459 ticks, collected in 2009, were screened for the occurrence of rickettsial DNA. An overall prevalence of 6.4 to 7.7% (n= 285, including 16 pools of 76 larvae) was observed. Adult ticks were infected with 7.5%, nymphs with 6.8% and larvae in a range of 2.1 to 9.8% (Table 2). The differences between the developmental stages were not significant. The minimum prevalences in April (4.0%, $p < 0.05$) and September (3.5-6.6%, $p < 0.05$) were significantly lower in comparison to the prevalences observed in June (7.7 to 8.6%) and July (8.7 to 10.2%). One sampling site (M1) showed a significantly higher minimum prevalence than sampling site R2 ($p < 0.01$) as well as sampling sites M2, R1 and I1 ($p < 0.05$). However, the effects for these sampling sites are expected to disappear, if more than one larva per positive pool was assumed to be infected.

285 samples yielded bands of the appropriate size in the PCR, targeting the *gltA*-gene of *Rickettsia* spp.. Sequence analysis showed in 268 samples 100% homology to sequences of *R. helvetica* [GenBank: HM371185, EU359287-EU359297, EU596563, EF392725, DQ821857, AM418450, DQ910785]. All 268 samples were 100% identical to each other. The remaining 17 samples, identified as *R. monacensis* and unspecified *Rickettsia* spp. were further analysed with a PCR, targeting the *ompB* gene. 12 samples were then specified as *R. monacensis* strain IrR/Munich, 4 additional samples as *R. helvetica* (100% homolog to [GenBank: HQ232251, GU324465, AF123725]) and 1 sample yielded no band in the *ompB*-PCR. It was 100% homologous to sequences of unspecified *R. monacensis* in *gltA*-gene sequence analysis [GenBank: EU853831, FJ009429]. The *R. monacensis* strain IrR/Munich sequences were 99-100% identical to each

other, with a difference in one nucleotide position (100% homolog to [GenBank: EU330639] and [GenBank: EU330640], respectively).

Exemplary sequences of *R. helvetica* were chosen for the 268 sequences of 100% identity with the following accession numbers: *gltA*-gene: [GenBank: JN036402-JN036410]; *ompB*-gene: [GenBank: JN036411-JN036412]; Sequences of *R. monacensis* strain IrR/Munich were deposited in GenBank [GenBank: JN036413-JN036417 and GenBank: JN036418-JN036419].

Molecular detection of *Bartonella* spp.

4,459 ticks from 2009 were screened for the occurrence of DNA of *Bartonella* spp.. Five samples (0.1%) showed an appropriate band. However, sequence analysis of the PCR product revealed only 85 to 100% similarity to various sequences of uncultivated *Bartonella* spp. Further investigations to amplify a sequence of the *16S rRNA*-, *gltA*- and *16S-23S*-gene of *Bartonella* spp. and consequently species identification failed (data not shown).

Coinfections

4,459 samples (3,685 for *A. phagocytophilum*) were screened for coinfections of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum* and *Bartonella* spp. in 2009 and 1,884 samples for *Babesia* spp. and *A. phagocytophilum* in 2010. The detailed results for *A. phagocytophilum* will be reported elsewhere [Schorn et al. unpublished]. In 2009, 0.7% of the samples (n= 27) were positive for *R. helvetica* and *A. phagocytophilum*, 0.1% (n= 4, including 3x *Babesia* sp. EU1 and 1x *B. gibsoni*-like) for *Babesia* spp. and *A. phagocytophilum* and 0.04% (n= 2, including *Babesia* sp. EU1 and *B. divergens*) for *Babesia* spp. and *R. helvetica*. No triple or quadruple infections of ticks were detected in 2009. In 2010, no coinfections between *Babesia* spp. and *A. phagocytophilum* were observed.

Discussion

The results of this study show that tick-borne pathogens can occur not only in natural woodlands, but also in recreational urban areas. This demonstrates the importance of systematic investigations of different habitat types to broaden the understanding and knowledge about these pathogens and their tick vector.

Table 2: Prevalence of tick-borne pathogens detected in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany, 2009/2010

sites	year	No. of investigated ticks			positive ticks (in %)					
		A	N	L pool [n]	<i>Babesia</i> spp.		<i>Rickettsia</i> spp.			
*M1	2009	302	87	4 [14]	0	0	0	0	0	
	2009	344	156	24 [120]	1 (0.3)	0	0	16 (4.7)	11 (7.1)	2 [10] (1.7-8.3)
M2	2010	267	150	3 [9]	0	0	0	n.d.	n.d.	
	2009	300	150	21 [102]	4 (1.3)	1 (0.7)	0	29 (9.7)	7 (4.7)	2 [10] (2.0-9.8)
M3	2010	272	150	23 [106]	5 (1.8)	0	1 [5] (0.9-4.7)	n.d.	n.d.	n.d.
	2009	263	129	20 [94]	0	0	0	13 (4.9)	9 (7.0)	0
R1	2010	238	150	11 [50]	2 (0.8)	0	0	n.d.	n.d.	n.d.
	2009	213	145	14 [63]	2 (0.9)	0	1 [2] (1.6-3.2)	9 (4.2)	5 (3.4)	1 [1] (1.6)
*R2	2009	328	156	19 [91]	0	0	0	16 (4.9)	11 (7.1)	2 [10] (2.2-11.0)
	2010	203	142	14 [70]	1 (0.5)	0	0	n.d.	n.d.	n.d.
*I2	2009	344	143	24 [109]	2 (0.6)	0	0	34 (9.9)	7 (4.9)	5 [25] (4.6-22.9)
	2009	166	83	19 [91]	0	0	0	10 (6.0)	8 (9.6)	4 [20] (4.4-22.0)
*A	2009	235	141	21 [90]	3 (1.3)	2 (1.4)	0	21 (8.9)	14 (9.9)	0
	2010	162	150	5 [15]	0	2 (1.3)	0	n.d.	n.d.	n.d.
B	2009	330	85	3 [13]	0	0	0	15 (4.5)	2 (2.4)	0
	2009	540	211	12 [51]	4 (0.7)	0	0	34 (6.3)	19 (9.0)	1 [5] (2.0-9.8)
*April	2010	300	150	6 [30]	0	1 (0.7)	0	n.d.	n.d.	n.d.
	2009	531	261	42 [202]	3 (0.6)	3 (1.1)	0	50 (9.4)	25 (9.6)	2 [10] (1.0-5.0)
June	2010	300	150	8 [39]	4 (1.3)	0	1 [5] (2.6-12.8)	n.d.	n.d.	n.d.
	2009	463	195	26 [115]	3 (0.6)	0	0	49 (10.6)	15 (7.7)	3 [15] (2.6-13.0)
July	2010	257	150	9 [37]	1 (0.4)	1 (0.7)	0	n.d.	n.d.	n.d.
	2009	396	228	43 [201]	3 (0.8)	0	1 [2] (0.5-1.0)	29 (7.3)	14 (6.1)	5 [21] (2.5-10.4)
August	2010	187	142	14 [66]	3 (1.6)	0	0	n.d.	n.d.	n.d.
	2009	235	210	40 [192]	0	0	0	11 (4.7)	6 (2.9)	5 [25] (2.6-13.0)
September	2010	98	150	19 [78]	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.
	2009	2495	1190	166 [774]	13 (0.5)	3 (0.3)	1 [2] (0.1-0.3)	188 (7.5)	81 (6.8)	16 [76] (2.1-9.8)
total	2010	1142	742	56 [250]	8 (0.7)	2 (0.3)	1 [5] (0.4-2.0)	n.d.	n.d.	n.d.
	2009	1142	742	56 [250]	13 (0.5)	3 (0.3)	1 [2] (0.1-0.3)	188 (7.5)	81 (6.8)	16 [76] (2.1-9.8)
species	2010			19 x <i>B. EU1</i>	4 x <i>B. EU1</i>	2 x <i>B. EU1</i>	180 x <i>R. helv</i>	77 x <i>R. helv</i>	15 x <i>R. helv</i>	
	2009			1 x <i>B. div/cap</i>	1 x <i>B. div</i>		7 x <i>R. mon IIR</i>	4 x <i>R. mon IIR</i>	1 x <i>R. mon IIR</i>	
				1 x <i>B. gibbs-l.</i>			1 x <i>R. mon</i>			

*no investigation in 2010; A: adult ticks, N: nymphs, L: larvae; n.d.: not detected; s.f.: sequence failed; Species: *B. EU1*: *Babesia* sp. EU1; *B. div*: *Babesia* divergens; *B. div/cap*: *Babesia divergens/capreoli*; *B. gibbs-l.*: *B. gibsoni*-like; *R. helv*: *Rickettsia helvetica*; *R. mon IIR*: *Rickettsia monacensis* IIR/Munich; *R. mon*: *Rickettsia monacensis*

The evidence of *Babesia* sp. EU1 in *I. ricinus* collected in Bavarian public parks adds a new species to the current knowledge on tick-borne *Babesia* spp. in Germany. Previous studies demonstrated the occurrence of *B. microti* and *B. divergens* in ticks with a predominance of *B. divergens* in Southern Germany and almost equal distribution of *B. divergens* and *B. microti* in Central Germany [13, 58, 59]. On the contrary, in this study *Babesia* sp. EU1 was the dominating *Babesia* species. However, not only the distribution of *Babesia* species differs geographically; the infection rates of ticks in Southern Germany are also lower (about 1%) than in Central Germany (up to 10.7%) [13, 58-60]. The overall prevalence of 0.4 to 0.5% for *Babesia* spp. detected in this study was comparable to these results. A similar variability of both the *Babesia* spp. prevalences and the arrangement of species within a country could also be recognized in Austria (local variations: 0 to 100%) [19], in Switzerland (0.7 to 4%) [12, 61] and in Poland (0.6 to 16.3%) [17, 20, 62-64]. Such a local clustering of *Babesia* spp. may be associated with the tick density in the investigated habitat. The maintenance of the protozoan life cycle by transovarial transmission, which has been demonstrated for *B. divergens* and *Babesia* sp. EU1, is more efficient in areas with a high tick density [19, 61, 65, 66]. Moreover, most of the *Babesia* spp. positive ticks were found on sampling sites M3 and B in this study. This is an interesting fact, because both areas are known to harbor a permanent population of large mammals like roe- and red deer in contrast to the other sites where those animals are missing or only transiently present. Beside *I. ricinus*, cervids, like roe deer, are discussed as potential reservoir for *B. divergens* and *Babesia* sp. EU1 [67-69].

It is noteworthy that no *B. microti* were detected in these public parks. Microtine rodents and shrews are suggested to be reservoir hosts for *B. microti* [70, 71]. Our findings are supported by the fact that another study from Southern Germany showed that rodents of the family Muridae were not infected with *B. microti*, whereas rodents of the family Arvicolidae were infected at a rate of 1.6% [72]. Therefore a possible explanation for the lack of *B. microti* in *I. ricinus* in public parks may be the occurrence and arrangement of rodent and insectivore species, which can be dissimilar to woodland areas [73].

A very interesting result is the finding of a 445bp sized *18S rRNA* gene sequence, 100% homologous to existing sequences of *B. gibsoni* in GenBank. Although this is not evidence for the occurrence of *B. gibsoni* in *I. ricinus*, it is a hint that *I. ricinus* could potentially harbor *Babesia* of the gibsoni-complex. *B. gibsoni*, a small *Babesia* and one of the agents causing canine babesiosis, is distributed all over the world, but only sporadically found in Europe. Recently, Zahler et al. [74] postulated that *B. gibsoni* has to be divided in two different lineages with isolates from Asia belonging to the *Babesia* spp. sensu stricto clade and isolates from the USA being more related to *Theileria* spp. So far, the classification of the European isolates of *B. gibsoni* has not been fully determined [75]. The sequence obtained in this study was in the amplified part 100% homologous to sequences of both lineages, thus no specification was possible. Further studies will help to clarify if *I. ricinus* could potentially serve as competent vector for additional *Babesia* spp. than assumed so far [62]. This would bring a new aspect into the epidemiology of canine babesiosis in Central Europe and offer a possible explanation for two clinical cases of canine babesiosis in Southern Germany assumedly leaded back to *B. gibsoni*. These two dogs with no history of travelling, blood transfusion or dogfights showed *Babesia*-like parasites in blood smear examination and 100% identity to *B. gibsoni* (Asian genotype) in sequencing of the *18S rRNA* gene [76].

The overall prevalence of *Rickettsia* spp. detected in Bavarian public parks in this study, which is 6.4 to 7.7%, was comparable to results of previous studies in Germany. In Southern Germany prevalences of 5.3 to 12% were previously detected, whereas prevalences up to 14.7% were recorded in eastern federal states of Germany [13, 58, 77-81]. The occurrence and arrangement of *Rickettsia* species (95% *R. helvetica* and 5% *R. monacensis*) were also similar to previous results from Germany [77, 79, 82]. The distribution of *R. monacensis* in *I. ricinus* seems to show geographical distinctions between Northern and Southern Europe. In Southern and Eastern European countries *I. ricinus* was much more infected with *R. monacensis* than with other spotted fever group Rickettsiae [83, 84], in Central Europe *R. monacensis* was only sporadically found beside the main agent *R. helvetica* [16, 79] and in Northern Europe *R. helvetica* exclusively was found in *I. ricinus* [85, 86].

Rickettsial prevalences vary geographically in European countries from 1.5 to >40.6% [32, 86]. Beside this, local, seasonal and annual prevalence variations of *Rickettsia* spp. were seen as well as differences between habitat-types [32, 87, 88]. In this study local prevalence differences (between 3.6 and 12.2% depending on sampling site) as well as seasonal variations (highest prevalences in June and July) were also demonstrated. To date, the reasons for these variations are not well understood, but a correlation between tick density and the occurrence for *Rickettsia* spp. is suggested, because of the reservoir role of the ticks in the maintenance of rickettsial life cycle [87].

In this study the occurrence of *Bartonella* spp. in *I. ricinus* could not be definitively demonstrated, because sequence similarity of >85% is not sufficient for specification. Three potential reasons could be the decisive factor for this result: (i) The sensitivity of the method used with ticks as template tissue; the amount of detectable *Bartonella* DNA may have been too low in the individually investigated ticks. (ii) Urban areas were exclusively investigated in this study and may not serve as suitable habitat for the maintenance of the life cycle of *Bartonella* spp. in ticks, because of a lack of competent reservoir host. (iii) The tick *I. ricinus* may not play an important role in the transmission of *Bartonella* spp. [39, 89].

Coinfections with different pathogens were recognized in 34 ticks (0.9%) in 2009. Most of them (n= 27) were infections with *R. helvetica* and *A. phagocytophilum*, i.e. 0.7% of all investigated ticks. This is comparable with previous studies; 0.5 to 1% of ticks were infected with *Rickettsia* spp. and *A. phagocytophilum* in different European countries [77, 84, 86, 90]. On the contrary, lower loads of double infections were also observed in other studies with 0.1% in Luxembourg and with 0.2% in Germany [16, 58]. However, this can be traced back to the fact that *A. phagocytophilum* was only detected with low prevalences (1.9% and 1% accordingly), whereas in the ticks investigated in this study *A. phagocytophilum* was detected with an average prevalence of 9.5% in 2009 and 6.6% in 2010 [Schorn et al. unpublished data]. Furthermore, coinfections with the other pathogens were sporadically found in this study (0.04 to 0.1%). Double infections with *Babesia* spp. and *A. phagocytophilum* were previously found in 0.3% of ticks

in Germany and 0.7 to 2% in Poland [13, 50, 91]. Coinfections between *Babesia* spp. and *Rickettsia* spp. were previously detected in Italy, Luxembourg and Germany with 0.1 to 0.6% [13, 16, 92]. Additional data about the occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in public parks would enrich the current knowledge on the dynamics of coinfections in *I. ricinus* in urban areas. Previous epidemiological studies from Germany on *Borrelia burgdorferi* sensu lato show that 1.0% of all investigated ticks in the ‘English Garden’ in Munich (sampling site M2 in this study) were coinfecting with *A. phagocytophilum* as well as 0.2% with *Babesia* spp., whereas the most prevalent coinfection in woodland areas was with *Babesia* spp. (2.6%) and none was detected with *A. phagocytophilum* [13, 60].

Conclusions

This study shows that several pathogens including *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *A. phagocytophilum* are present in ticks in public parks in Germany and coinfections of these agents comparable to other habitats and other European countries were demonstrated. Even though the level of pathogenicity of these detected pathogens is not yet fully known, it can be assumed that people visiting public parks and their companion animals may be at risk when coming into contact with these agents. Therefore, visitors to urban public parks, public health officials and physicians should be made aware of the potential risk of tick bites and the possible medical consequences on the urban population.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

SS performed the experiments, analyzed the data and drafted the manuscript. CS conceived and designed the experiments and gave critical proposals in every step of development. HR and MM performed the statistical analysis. KP conceived the idea of the study. CS and KP critically reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to Claudia Thiel and Tim Tiedemann for technical assistance and Prof. Dr. Edward Sinski (Department of Parasitology, Faculty of Biology, Warsaw, Poland) for providing the positive control of *Babesia microti* from BALB/c mice (King's college strain from S. Randolph). This study is part of the research project VICCI (Vector-borne Infectious Diseases in Climate Change Investigation) and was co-funded by the Bavarian State Ministry of the Environment and Public Health (Grant-No. K1 08 – 18 module 4).

References

1. Stanek G: **Büchse der Pandora: Krankheitserreger in Ixodes ricinus-Zecken in Mitteleuropa.** *Wien Klin Wochenschr* 2009, **121**:673-683.
2. Uilenberg G: **Babesia--a historical overview.** *Vet Parasitol* 2006, **138**:3-10.
3. Gray J, Zintl A, Hildebrandt A, Hunfeld K-P, Weiss L: **Zoonotic babesiosis: Overview of the disease and novel aspects of pathogen identity.** *Ticks Tick-borne Dis* 2010, **1**:3-10.
4. Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford SR, 3rd, Krause PJ, Persing DH: **Babesiosis.** *Clin Microbiol Rev* 2000, **13**:451-469.
5. Kjemtrup AM, Conrad PA: **Human babesiosis: an emerging tick-borne disease.** *Int J Parasitol* 2000, **30**:1323-1337.
6. Conrad PA, Kjemtrup AM, Carreno RA, Thomford J, Wainwright K, Eberhard M, Quick R, Telford SR, 3rd, Herwaldt BL: **Description of Babesia duncani n.sp. (Apicomplexa: Babesiidae) from humans and its differentiation from other piroplasms.** *Int J Parasitol* 2006, **36**:779-789.
7. Herwaldt B, Persing DH, Précigout EA, Goff WL, Mathiesen DA, Taylor PW, Eberhard ML, Gorenflot AF: **A fatal case of babesiosis in Missouri: identification of another piroplasm that infects humans.** *Ann Intern Med* 1996, **124**:643-650.
8. Herwaldt BL, Cacciò S, Gherlinzoni F, Aspöck H, Slemenda SB, Piccaluga P, Martinelli G, Edelhofer R, Hollenstein U, Poletti G, et al: **Molecular characterization of a non-Babesia divergens organism causing zoonotic babesiosis in Europe.** *Emerg Infect Dis* 2003, **9**:942-948.
9. Hildebrandt A, Tenter AM, Straube E, Hunfeld K-P: **Human babesiosis in Germany: Just overlooked or truly new?** *Int J Med Microbiol* 2008, **298**:336-346.
10. Hunfeld KP, Hildebrandt A, Gray JS: **Babesiosis: recent insights into an ancient disease.** *Int J Parasitol* 2008, **38**:1219-1237.

11. Cassini R, Bonoli C, Montarsi F, Tessarin C, Marcer F, Galuppi R: **Detection of *Babesia* EU1 in *Ixodes ricinus* ticks in northern Italy.** *Vet Parasitol* 2010, **171**:151-154.
12. Casati S, Sager H, Gern L, Piffaretti JC: **Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland.** *Ann Agric Environ Med* 2006, **13**:65-70.
13. Franke J, Fritzscht J, Tomaso H, Straube E, Dorn W, Hildebrandt A: **Co-existence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat of Central Germany.** *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**:6829-6836.
14. Katargina O, Geller J, Vasilenko V, Kuznetsova T, Järvekülg L, Vene S, Lundkvist A, Golovljova I: **Detection and Characterization of *Babesia* Species in *Ixodes* Ticks in Estonia.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011, doi:10.1089/vbz.2010.0199.
15. Radzijeuskaja J, Paulauskas A, Rosef O: **Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia divergens* in *Ixodes ricinus* ticks from Lithuania and Norway.** *Int J Med Microbiol* 2008, **298**:218-221.
16. Reye AL, Hübschen JM, Sausy A, Muller CP: **Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg.** *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**:2923-2931.
17. Skotarczak B, Cichočka A: **Isolation and amplification by polymerase chain reaction DNA of *Babesia microti* and *Babesia divergens* in ticks in Poland.** *Ann Agric Environ Med* 2001, **8**:187-189.
18. Wielinga PR, Fonville M, Sprong H, Gaasenbeek C, Borgsteede F, Giessen JW: **Persistent Detection of *Babesia* EU1 and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* in The Netherlands During a 5-Year Surveillance: 2003-2007.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008, **9**:119-122.
19. Blaschitz M, Narodoslavsky-Gföller M, Kanzler M, Stanek G, Walochnik J: ***Babesia* species occurring in Austrian *Ixodes ricinus* ticks.** *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**:4841-4846.
20. Siński E, Bajer A, Welc R, Pawełczyk A, Ogrzewalska M, Behnke JM: ***Babesia microti*: prevalence in wild rodents and *Ixodes ricinus* ticks from the Mazury Lakes District of North-Eastern Poland.** *Int J Med Microbiol* 2006, **296** (Suppl 40):137-143.
21. Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, Grab DJ, Bakken JS: **Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*.** *Emerg Infect Dis* 2005, **11**:1828-1834.
22. Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH: **Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease.** *J Clin Microbiol* 1994, **32**:589-595.
23. Doudier B, Olano J, Parola P, Brouqui P: **Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* spp. as human pathogens.** *Vet Parasitol* 2010, **167**:149-154.

24. Alberdi MP, Walker AR, Paxton EA, Sumption KJ: **Natural prevalence of infection with *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila* of *Ixodes ricinus* ticks in Scotland.** *Vet Parasitol* 1998, **78**:203-213.
25. Cinco M, Padovan D, Murgia R, Maroli M, Frusteri L, Heldtander M, Johansson KE, Engvall EO: **Coexistence of *Ehrlichia phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Italy as determined by 16S rRNA gene sequencing.** *J Clin Microbiol* 1997, **35**:3365-3366.
26. Socolovschi C, Mediannikov O, Raoult D, Parola P: **Update on tick-borne bacterial diseases in Europe.** *Parasite* 2009, **16**:259-273.
27. Beati L, Péter O, Burgdorfer W, Aeschlimann A, Raoult D: **Confirmation that *Rickettsia helvetica* sp. nov. is a distinct species of the spotted fever group of rickettsiae.** *Int J Syst Bacteriol* 1993, **43**:521-526.
28. Fernández-Soto P, Pérez-Sánchez R, Diaz Martin V, Encinas-Grandes A, Álamo Sanz R: ***Rickettsia massiliae* in ticks removed from humans in Castilla y Leon, Spain.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006, **25**:811-813.
29. Simser JA, Palmer AT, Fingerle V, Wilske B, Kurtti TJ, Munderloh UG: ***Rickettsia monacensis* sp. nov., a spotted fever group *Rickettsia*, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in a European city park.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**:4559-4566.
30. Nijhof AM, Bodaan C, Postigo M, Nieuwenhuijs H, Opsteegh M, Franssen L, Jebbink F, Jongejan F: **Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007, **7**:585-595.
31. Nilsson K, Jaenson TG, Uhnöo I, Lindquist O, Pettersson B, Uhlén M, Friman G, Pålsson C: **Characterization of a spotted fever group *Rickettsia* from *Ixodes ricinus* ticks in Sweden.** *J Clin Microbiol* 1997, **35**:243-247.
32. Christova I, Van De Pol J, Yazar S, Velo E, Schouls L: **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* 2003, **22**:535-542.
33. Parola P, Davoust B, Raoult D: **Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses.** *Vet Res* 2005, **36**:469-492.
34. Ciceroni L, Pinto A, Ciarrocchi S, Ciervo A: **Current knowledge of rickettsial diseases in Italy.** *Ann N Y Acad Sci* 2006, **1078**:143-149.
35. Fournier PE, Allombert C, Supputamongkol Y, Caruso G, Brouqui P, Raoult D: **Aneruptive fever associated with antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**:816-818.
36. Nilsson K, Elfving K, Pålsson C: ***Rickettsia helvetica* in patient with meningitis, Sweden, 2006.** *Emerg Infect Dis* 2010, **16**:490-492.
37. Nilsson K, Lindquist O, Pålsson C: **Association of *Rickettsia helvetica***

- with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet* 1999, **354**:1169-1173.
38. Angelakis E, Billeter SA, Breitschwerdt EB, Chomel BB, Raoult D: **Potential for tick-borne bartonellosis.** *Emerg Infect Dis* 2010, **16**:385-391.
39. Telford SR, 3rd, Wormser GP: ***Bartonella* spp. transmission by ticks not established.** *Emerg Infect Dis* 2010, **16**:379-384.
40. Anderson BE, Neuman MA: ***Bartonella* spp. as emerging human pathogens.** *Clin Microbiol Rev* 1997, **10**:203-219.
41. Halos L, Jamal T, Maillard R, Beugnet F, Le Menach A, Boulouis HJ, Vayssier-Taussat M: **Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* sp.** *Vet Res* 2005, **36**:79-87.
42. Hercík K, Hášová V, Janeček J, Branny P: **Molecular evidence of *Bartonella* DNA in ixodid ticks in Czechia.** *Folia Microbiol (Praha)* 2007, **52**:503-509.
43. Podsiadly E, Chmielewski T, Sochon E, Tylewska-Wierzbanska S: ***Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks removed from dogs.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007, **7**:189-192.
44. Sanogo YO, Zeaiter Z, Caruso G, Merola F, Shpynov S, Brouqui P, Raoult D: ***Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodida) removed from humans, Belluno province, Italy.** *Emerg Infect Dis* 2003, **9**:329-332.
45. Schouls LM, Van De Pol I, Rijpkema SG, Schot CS: **Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks.** *J Clin Microbiol* 1999, **37**:2215-2222.
46. Skotarczak B, Adamska M: **Detection of *Bartonella* DNA in roe deer (*Capreolus capreolus*) and in ticks removed from deer.** *Eur J Wildl Res* 2005, **51**:287-290.
47. Cotté V, Bonnet S, Cote M, Vayssier-Taussat M: **Prevalence of five pathogenic agents in questing *Ixodes ricinus* ticks from western France.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010, **10**:723-730.
48. Comer JA, Paddock CD, Childs JE: **Urban zoonoses caused by *Bartonella*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, and *Rickettsia* species.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2001, **1**:91-118.
49. Silaghi C, Gilles J, Höhle M, Fingerle V, Just FT, Pfister K: ***Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**:972-974.
50. Stańczak J, Gabre RM, Kruminis-Łozowska W, Racewicz M, Kubica-Biernat B: ***Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests.** *Ann Agric Environ Med* 2004, **11**:109-114.

51. Wielinga PR, Gaasenbeek C, Fonville M, de Boer A, de Vries A, Dimmers W, Akkerhuis Op Jagers G, Schouls LM, Borgsteede F, van der Giessen JW: **Longitudinal analysis of tick densities and *Borrelia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* infections of *Ixodes ricinus* ticks in different habitat areas in The Netherlands.** *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**:7594-7601.
52. Hillyard PD: *Ticks of North-West Europe, Synopses of the British Fauna No. 52.* London: The Linnean Society of London; 1996.
53. Maggi RG, Diniz PP, Cadenas MB, Breitschwerdt EB: **The Use of Molecular diagnostic Techniques to detect *Anaplasma*, *Bartonella* and *Ehrlichia* Species in Arthropods or Patients.** In *The International Canine Vector-Borne Disease Symposium; April 18th-20th, 2006; Billesley, Alcester, UK.* 2006: 9-14.
54. Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD: **Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes.** *J Bacteriol* 1991, **173**:1576-1589.
55. Roux V, Raoult D: **Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*ompB*).** *Int J Syst Evol Microbiol* 2000, **50** (Pt 4):1449-1455.
56. Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, Massung RF: **Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**:3164-3168.
57. Hothorn T, Bretz F, Westfall P: **Simultaneous Inference in General Parametric Models.** *Biom J* 2008, **50**:346-363.
58. Hartelt K, Oehme R, Frank H, Brockmann SO, Hassler D, Kimmig P: **Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany.** *Int J Med Microbiol* 2004, **293** (Suppl 37):86-92.
59. Hildebrandt A, Pauliks K, Sachse S, Straube E: **Coexistence of *Borrelia* spp. and *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* Ticks in Middle Germany.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010, **10**:831-837.
60. Leonhard S: **Untersuchungen zur Häufigkeit von *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* und *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* aus Bayern und Baden-Württemberg.** *doctoral thesis.* Ludwig-Maximilians-University, 2005.
61. Foppa IM, Krause PJ, Spielman A, Goethert H, Gern L, Brand B, Telford SR, 3rd: **Entomologic and serologic evidence of zoonotic transmission of *Babesia microti*, eastern Switzerland.** *Emerg Infect Dis* 2002, **8**:722-726.
62. Cieniuch S, Stańczak J, Ruczaj A: **The first detection of *Babesia* EU1 and *Babesia canis canis* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) collected in urban and rural areas in northern Poland.** *Pol J Microbiol* 2009, **58**:231-236.

63. Pieniżek N, Sawczuk M, Skotarczak B: **Molecular identification of Babesia parasites isolated from Ixodes ricinus ticks collected in northwestern Poland.** *J Parasitol* 2006, **92**:32-35.
64. Wójcik-Fatla A, Szymańska J, Wdowiak L, Buczek A, Dutkiewicz J: **Coincidence of three pathogens (*Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti*) in Ixodes ricinus ticks in the Lublin macroregion.** *Ann Agric Environ Med* 2009, **16**:151-158.
65. Bonnet S, Brisseau N, Hermouet A, Jouglin M, Chauvin A: **Experimental in vitro transmission of Babesia sp. (EU1) by Ixodes ricinus.** *Vet Res* 2009, **40**:21.
66. Bonnet S, Jouglin M, Malandrin L, Becker C, Agoulon A, L'Hostis M, Chauvin A: **Transstadial and transovarial persistence of Babesia divergens DNA in Ixodes ricinus ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique.** *Parasitology* 2007, **134**:197-207.
67. Bonnet S, Jouglin M, L'Hostis M, Chauvin A: **Babesia sp. EU1 from roe deer and transmission within Ixodes ricinus.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:1208-1210.
68. Duh D, Petrovec M, Bidovec A, Avsic-Zupanc T: **Cervids as Babesia hosts, Slovenia.** *Emerg Infect Dis* 2005, **11**:1121-1123.
69. Hilpertshauer H, Deplazes P, Schnyder M, Gern L, Mathis A: **Babesia spp. identified by PCR in ticks collected from domestic and wild ruminants in southern Switzerland.** *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**:6503-6507.
70. Bown KJ, Lambin X, Telford G, Heyder-Bruckner D, Ogden NH, Birtles RJ: **The Common Shrew (*Sorex araneus*): A Neglected Host of Tick-Borne Infections?** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011, doi:10.1089/vbz.2010.0185.
71. Karbowski G: **Zoonotic reservoir of Babesia microti in Poland.** *Pol J Microbiol* 2004, **53** (Suppl):61-65.
72. Hartelt K, Pluta S, Oehme R, Kimmig P: **Spread of ticks and tick-borne diseases in Germany due to global warming.** *Parasitol Res* 2008, **103** (Suppl 1):S109-116.
73. Dickman CR, Doncaster CP: **The Ecology of Small Mammals in Urban Habitats. I. Populations in a Patchy Environment.** *Journal of Animal Ecology* 1987, **56**:629-640.
74. Zahler M, Rinder H, Zweygarth E, Fukata T, Maede Y, Schein E, Gothe R: **'Babesia gibsoni' of dogs from North America and Asia belong to different species.** *Parasitology* 2000, **120** (Pt 4):365-369.
75. Criado-Fornelio A, González-del-Río MA, Buling-Saraña A, Barba-Carretero JC: **Molecular characterization of a Babesia gibsoni isolate from a Spanish dog.** *Vet Parasitol* 2003, **117**:123-129.
76. Hartelt K, Rieker T, Oehme RM, Brockmann SO, Müller W, Dorn N:

- First evidence of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) in dogs in Western Europe.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007, **7**:163-166.
77. Hildebrandt A, Krämer A, Sachse S, Straube E: **Detection of *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia).** *Ticks Tick-borne Dis* 2010, **1**:52-56.
78. Pichon B, Kahl O, Hammer B, Gray JS: **Pathogens and host DNA in *Ixodes ricinus* nymphal ticks from a German forest.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2006, **6**:382-387.
79. Silaghi C, Gilles J, Höhle M, Pradel I, Just FT, Fingerle V, Küchenhoff H, Pfister K: **Prevalence of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in southern Germany.** *J Med Entomol* 2008, **45**:948-955.
80. Wölfel R, Terzioglu R, Kiessling J, Wilhelm S, Essbauer S, Pfeffer M, Dobler G: ***Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Bavaria, Germany.** *Ann NY Acad Sci* 2006, **1078**:509-511.
81. Silaghi C, Hamel D, Thiel C, Pfister K, Pfeffer M: **Spotted Fever Group Rickettsiae in Ticks, Germany.** *Emerg Infect Dis* 2011, **17**:890-892.
82. Dobler G, Essbauer S, Wölfel R: **Isolation and preliminary characterisation of '*Rickettsia monacensis*' in south-eastern Germany.** *Clin Microbiol Infect* 2009, **15** (Suppl 2):263-264.
83. de Carvalho IL, Milhano N, Santos AS, Almeida V, Barros SC, De Sousa R, Nuncio MS: **Detection of *Borrelia lusitaniae*, *Rickettsia* sp. IRS3, *Rickettsia monacensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* collected in Madeira Island, Portugal.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008, **8**:575-579.
84. Movila A, Rolain JM, Podavalenko A, Toderas I, Tkachenco L, Naglov V, Raoult D: **Detection of spotted fever group rickettsiae and family Anaplasmataceae in *Ixodes ricinus* ticks from Republic of Moldova and Eastern Ukraine.** *Clin Microbiol Infect* 2009, **15** (Suppl 2):32-33.
85. Nilsson K, Lindquist O, Liu AJ, Jaenson TG, Friman G, Pählson C: ***Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in Sweden.** *J Clin Microbiol* 1999, **37**:400-403.
86. Severinsson K, Jaenson TG, Pettersson J, Falk K, Nilsson K: **Detection and prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in seven study areas in Sweden.** *Parasit Vectors* 2010, **3**:66.
87. Kantsø B, Bo Svendsen C, Moestrup Jensen P, Vennestrøm J, Krogfelt KA: **Seasonal and habitat variation in the prevalence of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks from Denmark.** *Ticks Tick-borne Dis* 2010, **1**:101-103.
88. Sprong H, Wielinga PR, Fonville M, Reusken C, Brandenburg AH, Borgsteede F, Gaasenbeek C, van der Giessen JW: ***Ixodes ricinus* ticks**

- are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. *Parasit Vectors* 2009, **2**:41.
89. Tijssse-Klasen E, Fonville M, Gassner F, Nijhof AM, Hovius EK, Jongejan F, Takken W, Reimerink JR, Overgaauw PA, Sprong H: **Absence of zoonotic *Bartonella* species in questing ticks: First detection of *Bartonella clarridgeiae* and *Rickettsia felis* in cat fleas in the Netherlands.** *Parasit Vectors* 2011, **4**:61.
90. Halos L, Bord S, Cotté V, Gasqui P, Abrial D, Barnouin J, Boulouis HJ, Vayssier-Taussat M, Vourc'h G: **Ecological factors characterizing the prevalence of bacterial tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in pastures and woodlands.** *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**:4413-4420.
91. Skotarczak B, Rymaszewska A, Wodecka B, Sawczuk M: **Molecular evidence of coinfection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, human granulocytic ehrlichiosis agent, and *Babesia microti* in ticks from northwestern Poland.** *J Parasitol* 2003, **89**:194-196.
92. Piccolin G, Benedetti G, Doglioni C, Lorenzato C, Mancuso S, Papa N, Pitton L, Ramon MC, Zasio C, Bertiato G: **A study of the presence of *B. burgdorferi*, *Anaplasma* (previously *Ehrlichia*) *phagocytophilum*, *Rickettsia*, and *Babesia* in *Ixodes ricinus* collected within the territory of Belluno, Italy.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2006, **6**:24-31.

4.4.3 Publikation 3

First record of *Ixodes frontalis* collected by flagging in Germany

Sabine Schorn, H. Schöl, Kurt Pfister, Cornelia Silaghi

Ticks and Tick-borne Diseases (2011) 2, 228– 230.

Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-University, Munich,
Germany

First record of *Ixodes frontalis* collected by flagging in Germany

S. Schorn, H. Schöl, K. Pfister and C. Silaghi

Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-
University, Munich, Germany

Corresponding author:

Sabine Schorn

Comparative Tropical Medicine and Parasitology

Leopoldstraße 5

80802 Munich

Germany

Tel.: +49 89 21 80 28 16

Fax: +49 89 21 80 36 23

E-mail address: sabine.schorn@tropa.vetmed.uni-muenchen.de

Abstract

For the first time, a female specimen of *Ixodes frontalis* was collected using the flagging method in a public park in the Bavarian city of Ingolstadt, Germany. Previous reports were from migratory birds only. Therefore this is the first evidence that *I. frontalis* may be part of the tick fauna of Germany.

Keywords

Ixodes frontalis, ticks, Germany, flagging method, morphology, *Ixodes ricinus*

Introduction

The tick *Ixodes (I.) frontalis* was first described by Panzer (1795). Synonymic names are *Ixodes pari* Leach, 1815 and *Ixodes apronatus* Kirschenblatt, 1934 (Arthur, 1963). It is an ornithophilic ectoparasite and associated with many different bird species. Typical hosts are, among others, the Greenfinch (*Emberiza schoeniclus*), the Large tomtit (*Parus major*) and the Black thrush (*Turdus merula*) (Doby, 1998; Hillyard, 1996; Pomerantzev, 1950).

Schulze (1933) reported that this species has not been found in Germany since Panzer's report and extensive literature research showed only 2 more records in Germany, from the North Sea coastline and the island of Helgoland, accordingly. In both cases, the ticks had been detected on migratory birds only (Walter et al., 1986; Walter et al., 1979).

I. frontalis is suspected to cause avian tick-related syndrome (TRS), a sickness associated with toxic agents in tick saliva, observed in the UK and France some years ago (Monks et al., 2006). Furthermore, *I. frontalis* was found to harbor a new phlebovirus with unknown pathogenicity, called Chizé virus as well as *Borrelia burgdorferi* sensu lato in coexistence with infected *I. ricinus* on birds (Chastel et al., 1999; Estrada-Peña et al., 1995). However, there is no evidence that *I. frontalis* can sustain this pathogen in the absence of the principal vector, *Ixodes ricinus* (Estrada-Peña et al., 1995).

Here we report for the first time the collection of an adult female specimen of *I. frontalis* by flagging the vegetation of a city park in Germany.

Material and Methods

‘Glacis’ is a 120-ha public park in the Bavarian city of Ingolstadt. Originally built as part of a fortification, it is today a ring-like urban green, surrounding the historic city center of Ingolstadt and divided in 6 park-units. Many trails, which cross the city park, are frequently used for recreational activities like jogging and biking (<http://www2.ingolstadt.de>). The vegetation consists of bushes and deciduous trees like Norway maple (*Acer platanoides*), European beech (*Fagus sylvatica*) and Horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*). Furthermore, there is abundant cover and leafy undergrowth, providing a suitable microclimate for ticks (personal observations).

The female specimen of *I. frontalis* was collected by flagging as part of a research project on *I. ricinus* in the park unit “Künettegraben” (altitude 374m, 48°45′44.30”N, 11°24′51.38”E) and stored in 70% ethanol. The tick was identified by morphological characteristics according to Hillyard (1996), Arthur (1963) and Pomerantzev (1950). After identification, for best preservation of the biological material, dehydration was performed with acetone (the tick incubated for 1 hour in 70%, 80% and 90% acetone each and in 100% acetone for 24 hours) and drying was carried out in the critical point dryer Baltec CPD 030 (Leica Microsystems, Germany) with CO₂ substitutional for acetone. For scanning electron microscopy, the tick was fixed on a graphite-covered sample holder and sputter coated with goldpalladium in the sputter coater Baltec SCD 040 (Leica Microsystems, Germany). The Digital Scanning Microscope DSM 950 (Zeiss, Germany) with a digital Pentax K20D camera was used for photography.

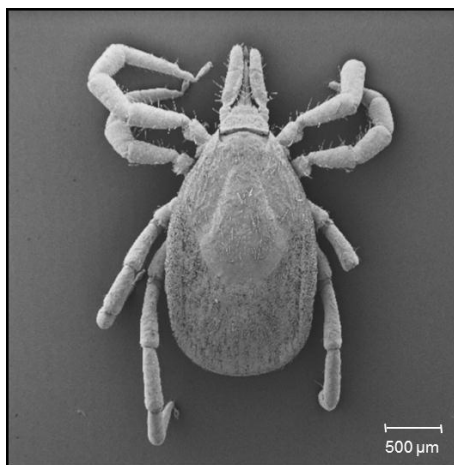


Figure 1: *Ixodes frontalis*

Dorsal view of an adult female *Ixodes frontalis*. The right leg III was broken during preparation.

Results

The main morphological characters diagnostic for *I. frontalis* are listed in the following including the main differences from *I. ricinus*, the most common tick species in Germany.

(1) *Body*:

- a) Length, 2.8mm; greatest width, 1.3mm; large number of light-colored setae all over the body (Fig. 1, 2b and 2d).
- b) Scutum: oval-rhomboid with well noticeable scapulae (Fig. 2b).
- c) Genital aperture in the intercoxal space of coxae III, covered with a semi-lunar shaped apron (Fig. 2d). *I. ricinus*: genital aperture (adult female): between coxae IV.

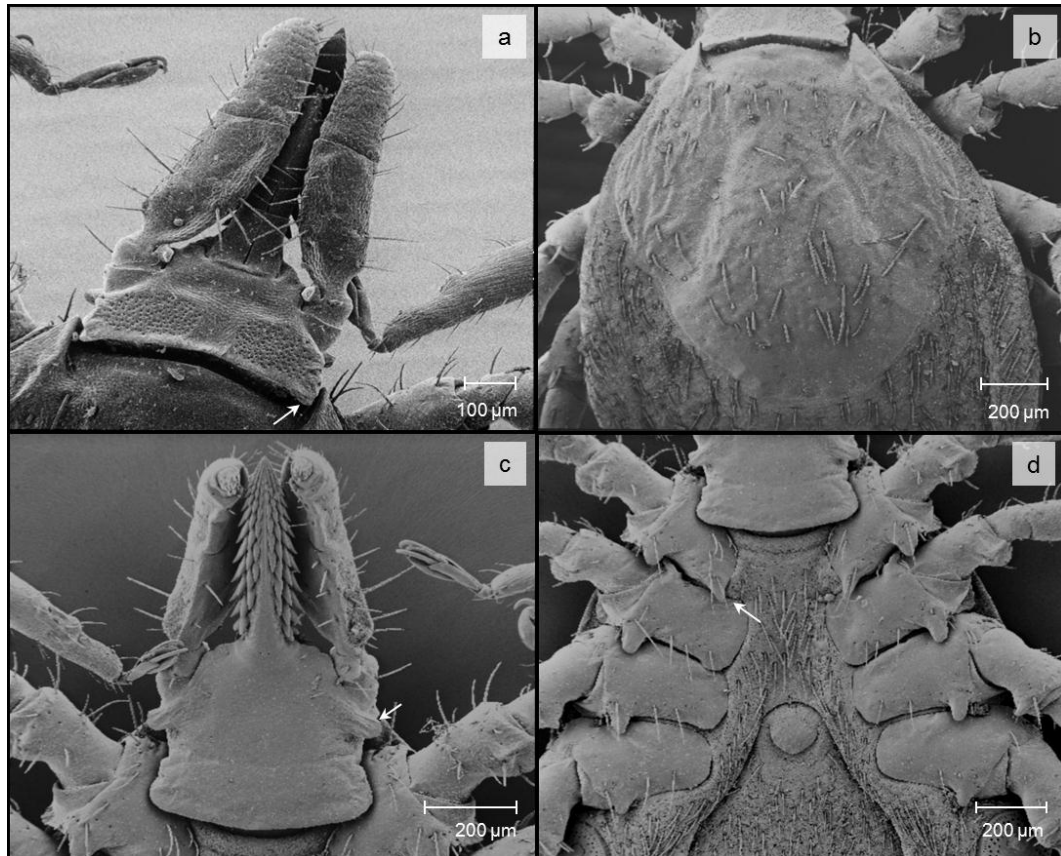


Figure 2: *Ixodes frontalis*

- (a) Dorsal view of the capitulum: cornuae (arrow) (b) dorsal view of the scutum with well-developed scapulae (c) ventral view of the capitulum: auriculae (arrow) (d) ventral view of the podosoma: internal spur on coxa I (arrow)

(2) *Capitulum*:

a) *Dorsal view*: Posterior margin of the basis with 2 well-developed cornuae (Fig. 2a arrow). *I. ricinus*: cornuae absent.

b) *Ventral view*: two well-developed button-like auriculae (Fig. 2c arrow). *I. ricinus*: auriculae reduced.

Hypostome: narrow and pointed (Fig. 2c). *I. ricinus*: hypostome: long, rounded apically.

(3) *Legs*:

Coxa I with internal spur (more slender than the blunt external spur) (Fig. 2d, arrow). External spurs also on coxae II–IV (Fig. 2d).

I. ricinus: internal spur on coxa I: long, pointed; external spurs on all coxae: short.

Discussion

This first finding of an actively questing adult female *I. frontalis* by flagging method in Germany is interesting because records of this species in Germany are rare. *I. frontalis* is reported to infest avian hosts in large parts of Europe, from Great Britain to the western part of Russia (Kolonin, 2009). Over the last 30 years, sporadic records of this species have been made from migratory birds in Finland (Laakkonen et al., 2009), Norway (Mehl, 1983), Sweden (Lundqvist et al., 1998) and former Yugoslavia (Tovornik, 1991), but it is uncertain if *I. frontalis* is established in these countries. Other evidences of *I. frontalis* come from France (Doby, 1998), Great Britain (Monks et al., 2006; Pietzsch et al., 2008), Czech Republic (Kocianova et al., 2001) and Switzerland (Papadopoulos et al., 2002), where ticks were found on both local and migratory birds. This could indicate that *I. frontalis* is potentially established in these countries or has been introduced during bird migration between Europe and Africa (Hoogstraal and Kaiser, 1961). Additional to these records from birds, two nymphs were collected in Spain by flagging method (Barandika et al., 2006). Just as the collection of an actively questing adult female *I. frontalis* in this study this indicates that the tick has passed through at least one molting in this area. This could mean either that an established population exists in this area or that the specimen survived after detachment from a migrating bird.

This record is the first evidence of *I. frontalis* as a possible member of the German tick-fauna since Panzer (1795) and further investigations should be undertaken to determine whether the city park in Ingolstadt serves as suitable habitat for an established population of *I. frontalis*. Additionally, this finding demonstrates the importance of thorough morphological species identification before completing molecular screening for pathogens in ticks. Without this important step of epidemiological work, potential new aspects on the knowledge of the tick fauna and ecology may be missed.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Matthias Stephan Kiefer, Bavarian State Collection of Zoology, for the confirmation of the tick species, Prof. Rüdiger Wanke, Institute of Veterinary Pathology, LMU Munich, for the opportunity to make the photos and Prof. Agustín Estrada-Peña, Department of Parasitology of the Veterinary Faculty, Zaragoza, for his critical review of the manuscript. This work was partially funded by the research project VICCI (Vector-borne Infectious Diseases in Climate Change Investigation); Bavarian State Ministry of the Environment and Public Health (Grant-No. K1 08–18 module 4).

References

- Arthur, D.R., 1963. British Ticks. Butterworths, London.
- Barandika, J.F., Berriatua, E., Barral, M., Juste, R.A., Anda, P., Garcia-Perez, A.L., 2006. Risk factors associated with ixodid tick species distributions in the Basque region in Spain. *Med. Vet. Entomol.* 20, 177-188.
- Chastel, C., Chandler, L., Le Goff, F., Chastel, O., Tesh, R., Shope, R., 1999. Chize virus, a new phlebovirus isolated in France from *Ixodes (Trichotoixodes) frontalis*. *Acta. Virol.* 43, 279-283.
- Doby, J.M., 1998. [Contribution to knowledge of the biology of *Ixodes (Trichotoixodes) pari* Leach (= *I. frontalis* (Panzer)) (Acari : Ixodidae), a bird-specific tick]. *Acarologia* 39, 315-325. article in French.
- Estrada-Peña, A., Oteo, J.A., Estrada-Peña, R., Gortazar, C., Osacar, J.J., Moreno, J.A., Castella, J., 1995. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks (Acari: Ixodidae) from two different foci in Spain. *Exp. Appl. Acarol.* 19, 173-

180.

Hillyard, P.D., 1996. Ticks of North-West Europe, Synopses of the British Fauna No. 52 (New Series). The Linnean Society of London, London.

Hoogstraal, H., Kaiser, M.N., 1961. Ticks from European-Asiatic birds migrating through Egypt into Africa. *Science* 133, 277-278.

Kocianova, E., Literak, I., Hauptmanova, K., Vostalova, E., 2001. [Unique finding of the tick *Ixodes frontalis* in a wintering greenfinch (*Carduelis chloris*)]. *Veterinarstvi* 51, 560. Article in Czech.

Kolonin, G.V., 2009. Fauna of Ixodid Ticks of the World (Acari, Ixodidae). Moscow. <http://www.kolonin.org>

Laakkonen, J., Terhivuo, J., Huhtamo, E., Vapalahti, O., Uzcátegui, N., 2009. First report of *Ixodes frontalis* (Acari: Ixodidae) in Finland, an example of foreign tick species transported by a migratory bird. *Memoranda Soc. Fauna Flora Fennica* 85, 16-19.

Lundqvist, L., Gray, J.S., Hillyard, P.D., 1998. *Ixodes frontalis* on the Baltic island of Gotland, Sweden. *Med. Vet. Entomol.* 12, 215-216.

Mehl, R., 1983. The distribution and host relations of Norwegian ticks (Acari, Ixodidae). *Fauna Norv. Ser.* 30, 46-51.

Monks, D., Fisher, M., Forbes, N.A., 2006. *Ixodes frontalis* and avian tick-related syndrome in the United Kingdom. *J. Small. Anim. Pract.* 47, 451-455.

Papadopoulos, B., Humair, P.F., Aeschlimann, A., Vaucher, C., Büttiker, W., 2002. Ticks on birds in Switzerland. *Acarologia* 42, 3-19.

Pietzsch, M.E., Mitchell, R., Jameson, L.J., Morgan, C., Medlock, J.M., Collins, D., Chamberlain, J.C., Gould, E.A., Hewson, R., Taylor, M.A., Leach, S., 2008. Preliminary evaluation of exotic tick species and exotic pathogens imported on migratory birds into the British Isles. *Vet. Parasitol.* 155, 328-332.

Pomerantzev, B.I., 1950. Fauna of U.S.S.R. Arachnida-Ixodid Ticks (*Ixodidae*), Vol 4 No. 2. The American Institute Of Biological Sciences, Washington

D. C.

Schulze, P., 1933. Neue und wenig bekannte deutsche Ixodes-Arten. Z. Parasitenk. 6, 432-437.

Tovornik, D., 1991. [Data on ticks *Ixodes frontalis* Panzer 1798 and *Ixodes arboricola* Schulze et Schlottke 1929 found on birds in Yugoslavia]. Bioloski Vestnik 39, 157-164. Article in Slovenian.

Walter, G., Kock, D., Liebisch, A., 1986. [Contribution to the tick fauna of West Germany (Arachnida: Acarina: Ixodidae)]. Senckenbergiana Biol. 67, 199-206. Article in German.

Walter, S., Liebisch, A., Vauk, G., 1979. [The biology and distribution of ticks Ixodoidea Ixodidae in North Germany 2. Tick infestation of migrating birds on the island of Helgoland]. Zeitschrift angewandte Zoologie 66, 445-462. Article in German.

5 Diskussion

Ziel dieser Studie war das Vorkommen von Zecken in bayerischen Parkanlagen über zwei Jahre zu untersuchen sowie die Prävalenz protozoarer und bakterieller Krankheitserreger mittels molekularer Methoden in diesen vom Menschen stark beeinflussten und genutzten Habitaten zu ermitteln.

In bayerischen Parkanlagen wurden Infektionsraten bei Zecken von 9,5% (2009) und 6,6% (2010) für *A. phagocytophilum*, 0,4% (2009) und 0,5-0,7% (2010) für *Babesia* spp. sowie 6,4-7,7% (2009) für *Rickettsia* spp. gezeigt. Für *A. phagocytophilum* stellt dies die lokal höchste Prävalenz in *I. ricinus* dar, die bisher in Deutschland ermittelt wurde (zwischen 1,0 und 5,4%) (Hartelt et al., 2004; Hildebrandt et al., 2010b). Fokal vergleichbare Werte (8,7% und 9,1%) konnten bisher nur in einem Stadtpark, dem Englischen Garten in München, entdeckt werden (Leonhard, 2005; Silaghi et al., 2008a). Dagegen sind Infektionsraten von *Babesia* spp. und *Rickettsia* spp. vergleichbar mit früheren Studien aus Deutschland mit Werten von 1,0-10,7% bzw. 5,3-14,7% (Franke et al., 2010a; Hartelt et al., 2004; Hildebrandt et al., 2010b; 2010c; Leonhard, 2005; Pichon et al., 2006; Silaghi et al., 2008b; 2011b; Wölfel et al., 2006). Ein interessanter Aspekt ist dabei, dass die Prävalenzen von *Babesia* spp. in *I. ricinus* scheinbar in Süddeutschland geringere Werte aufweisen als in Zecken aus Mitteldeutschland (Franke et al., 2010a; Hartelt et al., 2004; Hildebrandt et al., 2010c; Leonhard, 2005). Unterschiede zwischen urbanen Habitaten und Waldgebieten traten dabei nicht auf (Hildebrandt et al., 2010c; Pauliks, 2009).

Für *A. phagocytophilum* und *Rickettsia* spp. wurden lokale Prävalenzunterschiede zwischen den untersuchten Standorten festgestellt und für *Rickettsia* spp. zudem eine saisonale Häufung der Infektionsraten in den Monaten Juni und Juli. Solche fokalen und saisonalen Unterschiede der Infektionsraten konnten schon in früheren Studien beobachtet werden. Die Gründe sind jedoch aktuell noch nicht vollumfänglich verstanden (Christova et al., 2003; de Carvalho et al., 2008; Grzeszczuk und Stańczak, 2006a; Kantsø et al., 2010; Sprong et al., 2009). Für *Rickettsia* spp. wird davon ausgegangen, dass ein Zusammenhang besteht zwischen der Infektionsrate der Zecken und der Zeckendichte im untersuchten Habitat, da Zecken als Reservoir eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung des

Vermehrungszyklus innehaben (Kantsø et al., 2010). Diese Studie zeigte jedoch keine direkten Zusammenhänge zwischen der Zeckendichte und dem Auftreten der untersuchten Krankheitserreger in bayerischen Stadtparks. Es ist dennoch immer davon auszugehen, dass die Zeckendichte in einem Habitat die Wahrscheinlichkeit beeinflusst, mit der eine Zecke ein Wirtstier findet und damit auch die Wahrscheinlichkeit einen Krankheitserreger auf einen Wirt oder eine Zecke zu übertragen.

Zecken aus dem Englischen Garten in München zeigten in vorangehenden Studien signifikant höhere Infektionsraten mit *A. phagocytophilum* im Vergleich mit süddeutschen Waldgebieten (Leonhard, 2005; Silaghi et al., 2008a). Die Ergebnisse dieser Studie (acht von neun Stadtparks zeigten höhere Prävalenzen in Zecken als früher untersuchte deutsche Waldgebiete) bekräftigen die These, dass städtische Grünflächen fokale „Hot Spots“ für *A. phagocytophilum* darstellen könnten. Die Prävalenzen sind dabei vergleichbar mit Infektionsraten anderer europäischer städtischer Grünflächen mit Werten zwischen 9,0 und 24,4% (Cinco et al., 1997; Derdákóvá et al., 2003; Koči et al., 2007; Milutinović et al., 2008; Stańczak et al., 2004). Interessanterweise kann man für das Vorkommen von *Rickettsia* spp. in *I. ricinus* ein genau umgekehrtes Muster erkennen. Silaghi et al. (2008b) zeigten, dass Zecken aus städtischen Grünflächen signifikant weniger infiziert waren als Zecken aus naturbelassenen Waldflächen. Prävalenzen von *Rickettsia* spp. in dieser Studie (6,4-7,7%) waren in acht der neun untersuchten Parks ebenfalls geringer als in früher untersuchten Waldgebieten mit Werten zwischen 12,0 und 14,2% (Pichon et al., 2006; Silaghi et al., 2011b; Wölfel et al., 2006). Dagegen dokumentierte eine Studie aus den Niederlanden sogar eine 6-fach erhöhte Prävalenz für *Rickettsia* spp. in einem Stadtpark im Vergleich zu einem naturbelassenen Beprobungsgebiet (Sprong et al., 2009). Mögliche Erklärungen für die auftretenden Prävalenzvarianzen könnten neben Habitatsunterschieden auch unterschiedliches Vorkommen von Reservoirtieren sowie klimatische Faktoren darstellen. Das Habitat „Stadtpark“ nimmt dabei eine Sonderstellung ein. Durch den starken Einfluss des Menschen kann es zu einer Spezialisierung der im Stadtpark vorkommenden Tierarten kommen. Die Reduktion der Artenvielfalt in einem begrenzten Gebiet führt zu unterschiedlichem Auftreten, Verhalten oder Verfassung von Wirtstieren und/oder

Vektoren und damit zu einer potentiellen Veränderung im Vorkommen von Infektionserregern (Keesing et al., 2010). Zum Beispiel wurde für den zeckenübertragenen Erreger der Borreliose festgestellt, dass sich durch eine solche Spezialisierung in städtischen Gebieten ein „urbaner Lebenszyklus“ entwickeln kann (Keesing et al., 2010; Reye et al., 2010). Solch eine „Urbanisierung“ wird ebenfalls für die zeckenübertragenen Pathogene *A. phagocytophilum* und *Rickettsia* spp. diskutiert (Comer et al., 2001).

Der Nachweis von *Babesia* sp. EU1 in *I. ricinus* in bayerischen Parkanlagen ist von besonderem Interesse, da in vorangehenden Studien in Deutschland ausschließlich *B. divergens* und *B. microti* ermittelt wurden. In Süddeutschland wurde hauptsächlich die Spezies *B. divergens* nachgewiesen und in Mitteldeutschland die Spezies *B. microti* und *B. divergens* in annähernd gleicher Verteilung (Franke et al., 2010a; Hartelt et al., 2004; Hildebrandt et al., 2010c). In den untersuchten Grünanlagen wurde hingegen *Babesia* sp. EU1 als primär auftretende Art identifiziert. Interessanterweise wird das Reh (*C. capreolus*) als ein mögliches Reservoirtier für *Babesia* sp. EU1 diskutiert, in dieser Studie jedoch auch an Standorten dargestellt, an welchen kein Rehwild vorkommen kann (z.B. im Dörnbergpark in der Innenstadt von Regensburg) (Duh et al., 2005b; Hilpertshäuser et al., 2006; Tampieri et al., 2008). Dies könnte mit der Reservoirfunktion von *I. ricinus* für Babesien mit transovarieller Transmission erklärt werden (*B. divergens* und *Babesia* sp. EU1) (Bonnet et al., 2007a; 2007b). Ein weiterer interessanter Fund war der Nachweis einer 445bp großen Teilsequenz des 18S rRNA Gens, 100% identisch zu verschiedenen *B. gibsoni*-Isolaten. *B. gibsoni* wird zu den kleinen Babesien gezählt und ist einer der Krankheitserreger der Caninen Babesiose in den USA, Asien und sporadisch auch in Europa (Beck et al., 2009; Criado-Fornelio et al., 2003a; Irwin, 2009; Trotta et al., 2009). Der Fund einer Teilsequenz kann nicht als Beweis für *B. gibsoni* in *I. ricinus* angesehen werden, gibt jedoch einen Hinweis darauf, dass diese Zeckenart potentiell auch weitere Babesien beherbergen kann. Weitere Untersuchungen sind daher erforderlich, um die potentiell Rolle von *I. ricinus* als Vektor für die Canine Babesiose zu verifizieren (Cieniuch et al., 2009; Hellwig et al., 2009). Dies gäbe eine mögliche Erklärung für zwei autochthone klinische Fälle der Caninen Babesiose in Süddeutschland, welche höchstwahrscheinlich auf eine Infektion mit

B. gibsoni zurückzuführen sind (Hartelt et al., 2007).

Das Vorkommen von *B. microti* in *I. ricinus* aus bayerischen Grünanlagen konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Ein Hauptgrund dafür scheint im Fehlen notwendiger Reservoiertiere zu liegen, da die transovarielle Übertragung in Zecken im Lebenszyklus von *B. microti* keine Rolle zu spielen scheint (Gray et al., 2002). Feldmäuse (*Microtus* spp.) und Waldspitzmäuse (*S. araneus*) werden als Hauptreservoir für *B. microti* angenommen (Bown et al., 2011; Karbowskiak, 2004). Des Weiteren zeigte eine Studie aus Süddeutschland die Anwesenheit von *B. microti* ausschließlich in Nagern der Familie Aviculidae und kein Nachweis in Nagern der Familie Muridae (Hartelt et al., 2008). Dies würde das Fehlen von *B. microti* in Stadtparks erklären, da eine Untersuchung gezeigt hat, dass sich besonders Nager der Gattung *Apodemus* (Familie Muridae) an städtische Habitate anpassen und geeignete Lebensräume finden können (Dickman und Doncaster, 1987).

Aus den 285 *Rickettsia* spp. positiven Zecken ergab die Sequenzanalyse der amplifizierten Produkte in 95% *R. helvetica* (n= 272) und in den restlichen 5% *R. monacensis* (n= 13). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit vorangehenden Studien an *I. ricinus* in Deutschland (Dobler et al., 2009; Hildebrandt et al., 2010b; Silaghi et al., 2008b). Im Vergleich mit anderen europäischen Ländern fällt auf, dass sich die Häufigkeit des Auftretens von diesen zwei durch *I. ricinus* übertragenen Rickettsien geographisch unterscheidet. In Südeuropa ist *R. monacensis* die am häufigsten vorkommende Fleckfiebrickettsie in *I. ricinus*, wohingegen in Mitteleuropa diese Spezies nur noch sporadisch gefunden werden kann (de Carvalho et al., 2008; Movila et al., 2009; Reye et al., 2010; Silaghi et al., 2008b). In Nordeuropa wurde bisher ausschließlich *R. helvetica* in *I. ricinus* nachgewiesen (Nilsson et al., 1999a; Severinsson et al., 2010).

Infektionsraten der einzelnen Entwicklungsstadien ergaben in dieser Studie für *A. phagocytophilum* einen signifikanten Wert. Adulte Zecken waren in beiden untersuchten Jahren signifikant häufiger infiziert als Nymphen. Bei *Babesia* spp. und *Rickettsia* spp. waren alle Entwicklungsstadien gleich hoch infiziert. Das lässt sich daraufhin zurückführen, dass für die in dieser Studie gefundenen Babesien- (*Babesia* sp. EU1 und *B. divergens*) und Rickettsien-Arten neben der transstadialen auch die transovarielle Übertragung innerhalb der Zecke

beschrieben ist (Bonnet et al., 2007b; 2009; Parola und Raoult, 2001). Im Gegensatz dazu ist bei *A. phagocytophilum* nur die transstadiale Transmission zu beobachten (Ogden et al., 1998). Ein kompetentes Reservoirtier für *A. phagocytophilum* ist daher obligatorisch notwendig, um den Vermehrungszyklus aufrecht zu erhalten. Das Reh (*Capreolus capreolus*) wird als Hauptreservoir für *A. phagocytophilum* angesehen, dieser Krankheitserreger wurde jedoch auch schon in einer Vielzahl anderer größerer und kleinerer Säuger sowie in Vögeln nachgewiesen (Alberdi et al., 2000; Franke et al., 2010a; Hulínská et al., 2004; Liz et al., 2000; Petrovec et al., 2003; Skuballa et al., 2010; Stefanidesova et al., 2008). Der Stadtpark als Habitat für zeckenübertragene Krankheitserreger nimmt dabei eine besondere Stellung ein. Nachdem in einigen Grünanlagen (z.B. im Standort „Dörnbergpark“) die Anwesenheit von großen Säugetieren, wie Reh- und Rotwild, ausgeschlossen ist, jedoch die Prävalenzen von *A. phagocytophilum* in beiden untersuchten Jahren sehr hoch waren (2009: 14,3% und 2010: 12,4%), muss davon ausgegangen werden, dass noch andere Reservoirtiere in diesem Habitat vorkommen. Denkbar dafür wären neben Kleinsäugetern auch der Fuchs (*Vulpes vulpes*) oder der Igel (*Erinaceus europaeus*), welche sowohl in früheren Studien teils hohe Infektionsraten mit *A. phagocytophilum* aufwiesen als auch in städtischen Gebieten heimisch sind (Bown et al., 2009; Hartelt et al., 2008; Liz et al., 2000; Petrovec et al., 2003; Skuballa et al., 2010). Auch der Hund könnte in urbanen Gebieten eine Rolle in der Aufrechterhaltung des Lebenszyklus von *A. phagocytophilum* spielen. Studien aus Deutschland haben gezeigt, dass bis zu 50,1% der Hunde Antikörper gegen *A. phagocytophilum* aufwiesen (Barutzki et al., 2006; Jensen et al., 2007; Kohn et al., 2010). Ob jedoch die Dichte infizierter Hunde und die Frequenz der Parkbesuche sowie der kontinuierliche Eintrag neu infizierter Zecken ausreichend sind, um den Lebenszyklus dieses Pathogens aufrecht zu erhalten, muss in Folgestudien geklärt werden. Es besteht jedoch für den Hund ein Risiko bei einem Stadtparkbesuch in Bayern mit dem Erreger der Caninen Granulozytären Anaplasiose in Kontakt zu kommen.

Die Analyse von partiellen *16S rRNA* Gen-Sequenzen von *A. phagocytophilum* ergab in dieser Studie sechs verschiedene Varianten in Zecken aus bayerischen Parkanlagen (siehe Kapitel 4.4.1: Tabelle 4 und 5). In sieben von neun untersuchten Standorten war Variante „A“ die am häufigsten auftretende Sequenz

mit Ausnahme der Standorte M3 und B. Diese Sequenzvariante wurde bisher primär mit Zecken oder kranken und gesunden Hunden assoziiert (Baumgarten et al., 1999; Katargina et al., 2011b; Kybicová et al., 2009; Scharf et al., 2011; Silaghi et al., 2008a; von Loewenich et al., 2003a). Im Gegensatz dazu wurden die Varianten „X“ und „Y“, welche scheinbar häufig bei großen Säugetieren wie Reh- und Rotwild auftreten sowie der Prototyp des HGA-Erregers (GenBank U02521 und in dieser Studie: Variante „B“), nur an den Standorten M3 und B gefunden (Bown et al., 2009; Chen et al., 1994; Scharf et al., 2011; Silaghi et al., 2011a; Zeman und Pecha, 2008). Diese beiden Standorte haben einen stärker naturbelassenen Charakter und beherbergen eine hohe Dichte an Wildtieren, darunter auch Reh- und Rotwild. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass genetische Sequenzvarianten von *A. phagocytophilum* abhängig von der im entsprechenden Habitat auftretenden Wirtstierart unterschiedlich häufig vorkommen könnten. Zudem konnten Ergebnisse früherer molekularbiologischer Studien an *msp4*-, *ankA*- und *groEL*-Gensequenzen zeigen, dass genetische Varianten von *A. phagocytophilum* sich in ihrem Vorkommen in Reh- und Rotwild von anderen Tierarten und dem Menschen unterscheiden können (de la Fuente et al., 2005; Polin et al., 2004; Scharf et al., 2011).

Sowohl das Vorkommen von *A. phagocytophilum* als auch von *Babesia* spp. in *I. ricinus* wurde in dieser Studie über zwei Jahre beobachtet. Dabei waren die Infektionsraten für *Babesia* spp. über beide Jahre in den Zecken stabil, wohingegen sich ein Rückgang der durchschnittlichen Gesamtprävalenz von 2009 auf 2010 bei *A. phagocytophilum* als statistisch signifikant darstellte. Die konstante Infektionsrate von *Babesia* sp. EU1 und *B. divergens* konnte schon in vorangehenden Studien dargestellt werden. Jährliche Schwankungen innerhalb eines untersuchten Areals zeigten sich lediglich für *B. microti* (Gigandet et al., 2011; Pauliks, 2009; Wielinga et al., 2008). Dies lässt sich durch die Fähigkeit von *Babesia* sp. EU1 und *B. divergens* zur transovariellen Transmission in *I. ricinus* erklären, wohingegen das Vorkommen von *B. microti* von der Populationsdichte bestimmter Kleinsäuger abhängig ist, welche jährlichen und geographischen Schwankungen unterworfen sein kann.

Eine wie in dieser Studie ermittelte Prävalenzschwankung für *A. phagocytophilum* zwischen zwei untersuchten Jahren konnte ebenfalls in einer Studie aus Norwegen

mit Durchschnittswerten von 4.7% bis 11.8% sowie in einer Studie aus Polen über fünf Jahre (z.B. 15.9%, 50%, 2.5% to 22.7% für einen beprobten Standort) und einer Untersuchung aus den USA über drei Jahre festgestellt werden (Grzeszczuk und Stańczak, 2006b; Holman et al., 2004; Rosef et al., 2009). Mögliche Erklärungen wären sowohl eine nur temporär begrenzte, selbstlimitierende Infektion von Reserviertieren mit *A. phagocytophilum* sowie eine niedrigere Transmission von *A. phagocytophilum* und *B. burgdorferi* sensu lato in coinfizierten Zecken (Levin und Fish, 2001; Stafford et al., 1999). Auch Klimaveränderungen könnten einen Einfluss auf zeckenübertragene Pathogene haben (Gray et al., 2009). Im Besonderen der Härtegrad des Winters und die Menge an Regenfall werden als Einflussfaktoren für Zecken und die damit zusammenhängende Wahrscheinlichkeit der Transmission eines Pathogens diskutiert (Daniel et al., 2008; Dautel et al., 2008; Knap et al., 2009; Süss et al., 2008). Besonders interessant war in diesem Zusammenhang eine Seroprävalenzstudie aus Deutschland, in welcher gezeigt wurde, dass nach einem sehr kalten Winter keine Antikörper gegen *A. phagocytophilum* im Menschen nachgewiesen wurden, wohingegen nach einem milden Winter eine Seroprävalenz von 14% im darauffolgenden Sommer ermittelt wurde (Kowalski et al., 2006). Ergänzende Daten (Deutscher Wetterdienst) konnten zeigen, dass auch in der vorliegenden Studie die untersuchten Sammeljahre sich hinsichtlich der Niederschlagsmenge sowie des Härtegrades des jeweils vorangehenden Winters unterschieden (siehe Kapitel 4.4.1). Somit kann von der Möglichkeit ausgegangen werden, dass auch in Stadtparks klimatische Faktoren das Auftreten zeckenübertragener Pathogene beeinflussen könnten.

Die Anwesenheit von DNA von *Bartonella* spp. in *I. ricinus* in bayerischen Stadtparks konnte in dieser Studie nicht bewiesen werden. Die bioinformatische Auswertung der ermittelten Sequenzen aus fünf PCR-positiven Zecken (0,1%) ergab lediglich eine Übereinstimmung von > 85% zu bestehenden Sequenzen von *Bartonella* spp. in der Gendatenbank (höchste Ähnlichkeit zu nicht angezüchteten *Bartonella* spp. aus *Amblyomma americanum* Zecken; GenBank: EF559314-EF559315). Mögliche Erklärungen für dieses Ergebnis könnten sowohl in der Sensitivität der verwendeten Methode zu finden sein als auch in der Fragestellung, ob Zecken im Vermehrungszyklus von *Bartonella* spp. überhaupt eine Rolle

spielen können. Eine weitere Möglichkeit wäre das Fehlen eines passenden Reservoirtieres für die sehr wirtsspezifischen Bartonellen in städtischen Grünflächen. Aus dem Ergebnis lässt sich jedoch schließen, dass entweder DNA undifferenzierter Bartonellen in den Zecken vorlagen oder DNA genetisch verwandter Bakterien mitamplifiziert wurden, wie z. B. in vorangehenden Studien *Mesorhizobium* spp. (bodenassoziierte Bakterien) oder *Candidatus Midichloria mitochondrii* (Endosymbionten in Zecken) (Maggi und Breitschwerdt, 2005; Tjisse-Klasen et al., 2011).

Gesammelte *I. ricinus* Zecken im Jahr 2009 wurde auf Coinfektionen bezüglich aller drei untersuchten Pathogene überprüft. 0,7% (n= 27) aller untersuchten Zecken waren mit den Krankheitserregern *A. phagocytophilum* und *R. helvetica* befallen. Diese Daten decken sich mit Doppelinfektionen dieser beiden Erreger in früheren Studien aus Deutschland (0,2-1,0%) (Hartelt et al., 2004; Hildebrandt et al., 2010b). Studien aus Frankreich, Schweden und Moldawien ergaben vergleichbare Werte mit 0,5-0,9% (Halos et al., 2010; Movila et al., 2009; Severinsson et al., 2010). Eine niedrigere Coinfektionsrate von 0,1% wurde in Luxemburg ermittelt, welche sich jedoch auf die geringe Prävalenz von *A. phagocytophilum* (1,9%) zurückzuführen lässt (Reye et al., 2010). Doppelinfektionen zwischen *Babesia* spp. und *A. phagocytophilum* mit 0,1% und zwischen *Babesia* spp. und *Rickettsia helvetica* mit 0,04% waren in dieser Studie nur Einzelfunde. Beide Doppelinfektionen konnten in Deutschland schon zu jeweils 0,3% nachgewiesen werden (Franke et al., 2010a). Coinfektionen zwischen *Babesia* spp. und *A. phagocytophilum* wurden des Weiteren mit 0,7-2% in Polen nachgewiesen sowie Coinfektionen zwischen *Babesia* spp. und *Rickettsia helvetica* zu jeweils 0,1% in Italien und Luxemburg (Piccolin et al., 2006; Reye et al., 2010; Skotarczak et al., 2003; Stańczak et al., 2004). Klinisch zeigte sich, dass Doppelinfektionen durch zwei zeckenübertragene Krankheitserreger auch beim Menschen auftreten können und dabei häufig erschwerte klinische Verläufe zur Folge haben, die sich von Monoinfektionen unterscheiden (Belongia, 2002; Süß et al., 2004). Dabei spielten Coinfektionen mit *B. burgdorferi* sensu lato aufgrund der weltweit hohen Inzidenz der Lyme Borreliose eine besondere Rolle. Es ist interessant, dass Doppelinfektionen in den USA zwischen dem Erreger der Lyme Borreliose und *Babesia* spp. mit 2-19% sehr viel häufiger auftreten als solche

zwischen *B. burgdorferi* sensu lato und *A. phagocytophilum* (1-6%) (Belongia, 2002). Im Gegensatz dazu finden sich in Europa vergleichbare Werte für Doppelinfektionen von *B. burgdorferi* sensu lato mit *A. phagocytophilum* (zwischen 0,07% in Luxemburg und 8,4% in Bulgarien) bzw. *B. burgdorferi* sensu lato mit *Babesia* spp. (zwischen 0,2% in Frankreich und 5,9% in Mitteldeutschland) (Christova et al., 2001; Cotté et al., 2010; Hildebrandt et al., 2010c; Reye et al., 2010). Niedrigere Infektionsraten zeigten sich für *B. burgdorferi* sensu lato mit Fleckfiebrickettsien mit Werten zwischen 0,4 und 2,3% (de Carvalho et al., 2008; Halos et al., 2010). Interessant ist jedoch die Tatsache, dass Coinfektionen in der Relation zu teils fokal sehr hohen Monoinfektionen der einzelnen Erreger eher selten auftreten. Dies lässt sich durch die Unterschiede in den Lebenszyklen der Pathogene erklären (Bertolotti et al., 2006; Rosef et al., 2009; Sen et al., 2011). Coinfektionen in *I. ricinus* mit *B. burgdorferi* sensu lato für bayerische Stadtparks liegen momentan noch nicht vor, weiterführende Untersuchungen sind jedoch in Planung, um ein umfassenderes Bild der zeckenübertragenden Pathogene in deutschen urbanen Flächen zu gewinnen.

Das zu erwartende Verhältnis der Entwicklungsstadien von 1 : 10 : 100 von Adulten, Nymphen und Larven, welches in vorangehenden Studien in Waldgebieten gezeigt wurde, konnte in bayerischen Stadtparks nicht bestätigt werden (Barandika et al., 2010; Dobson et al., 2011). Der Anteil an gefundenen adulten Zecken war in dieser Studie sehr viel höher (in 2009 2 : 1,5 : 1 und in 2010 3 : 5 : 1). Auch im Verhältnis zu einer niederländischen Studie, in welcher eine städtische Grünfläche in die Probennahme eingeschlossen wurde, konnten überdurchschnittlich viele adulte Zecken gefunden werden, jedoch zeigte sich ebenfalls ein geringerer Anteil an gefangenen Larven (Verhältnis 1 : 9 : 6) (Wielinga et al., 2008). Ein möglicher Grund für den verhältnismäßig erhöhten Fund an adulten Zecken in den Stadtparks könnte auf die Sammelmethode zurückzuführen sein, welche möglicherweise Larven schlechter einfängt als die an höherer Vegetation wirtssuchenden Nymphen oder Adulten. Vergleichsstudien zeigten jedoch, dass verschiedene Sammelmethoden annähernd gleiche Erfolgsraten aufwiesen (Dobson et al., 2011). Eine weitere Erklärung wäre, dass das Vorkommen von nach Wirtstieren suchenden Zecken sich indirekt proportional

zur Wirtstierdichte verhält (Randolph, 2004). Eine hohe Dichte an Kleinsäugetern in städtischen Grünanlagen könnte ursächlich dafür sein, dass die Wahrscheinlichkeit Larven mit der Flaggmethode zu fangen, sinkt (Dickman und Doncaster, 1987).

Durch die monatliche Probennahme, die in dieser Studie durchgeführt wurde, konnte das saisonale Aktivitätsmuster von *I. ricinus* beobachtet werden. In fast allen beprobten Standorten konnten die Monate Mai und Juni als die aktivitätsreichsten Monate beobachtet werden. Die erhöhte Aktivität von *I. ricinus* im Herbst konnte in dieser Studie jedoch nicht oder nur schwach ausgeprägt gezeigt werden. Dies kann auch darauf zurückzuführen sein, dass in diesem Projekt keine Zeckensammlung im Oktober vorgenommen wurde. Studien aus Dänemark, Slowenien und Luxemburg zeigten jeweils bimodale Aktivitätsmuster für *I. ricinus*, jedoch war die Herbstaktivität teils erst im Oktober deutlich erkennbar (Kalsbeek und Frandsen, 1996; Knap et al., 2009; Reye et al., 2010).

Im Vergleich zu anderen europäischen Stadtparks mit durchschnittlich „geringer“ bis „mittlerer Zeckendichte“ nach Schwarz et al. (2009) ist die Zeckendichte in bayerischen Stadtparks gleich hoch oder teils sogar höher („mittlere“ – „sehr hohe Zeckendichte“ abhängig vom Standort) (Dobson et al., 2011; Junttila et al., 1999; Reye et al., 2010; Wielinga et al., 2006). Jedoch hat sich gezeigt, dass die Zeckendichte stark von der vorhandenen Bodenvegetation abhängt, auch innerhalb eines Standortes (Dobson et al., 2011; Tijssen et al., 2010; Wielinga et al., 2006). Eine Studie aus Süddeutschland, welche in Waldgebieten eine „geringe“ bis „mittlere“ Zeckendichte ermittelte und eine Studie aus dem Siebengebirge mit 56,5% der beprobten Fläche mit „mittlerer“ bis „sehr hoher“ Zeckendichte zeigt die weite Spannweite der Zeckendichte, die in Deutschland gefunden werden kann (Kupêa, 2009; Schwarz et al., 2009). Daraus lässt sich schließen, dass in Deutschland Zecken in fast allen Habitaten vorkommen können, die Zeckendichte jedoch stark von der Vegetationsstruktur und der Wirtstierdichte abhängt. Dies sollte das Bewusstsein schärfen, dass auch in städtischen Grünanlagen besonders aufgrund ihres hohen freizeithlichen Nutzwertes in den warmen Monaten des Jahres die Wahrscheinlichkeit besteht, mit Zecken in Kontakt zu kommen.

6 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Studie haben gezeigt, dass in bayerischen Stadtparks verschiedene zeckenübertragene Pathogene wie *Babesia* spp., *A. phagocytophilum* und *Rickettsia* spp. in mono- oder coinfizierten *I. ricinus* vorkommen können. Sowohl die durchschnittlich hohe Zeckendichte von *I. ricinus* als auch die teils hohen Prävalenzen (z. B. für *A. phagocytophilum*) zeigen, dass der Stadtpark ein Habitat von besonderem wissenschaftlichen Interesse darstellt. Es ist von entscheidender Bedeutung, unterschiedliche Zeckenhabitats auch zukünftig unter Einbezug von Klimadaten und Zeckendichte systematisch zu untersuchen, um noch mehr über die Ökologie verschiedener zeckenübertragener Pathogene in Erfahrung zu bringen, da besonders städtische Habitats sich teils stark von Waldgebieten unterscheiden können. Solche epidemiologischen Studien sind Grundvoraussetzung für eine zukünftige Risikoabschätzung für die Human- und Tiermedizin. Daher sollten sowohl Menschen, die in städtischen Gebieten wohnen, als auch Ärzte und staatliche Gesundheitseinrichtungen sich der Möglichkeit bewusst werden, dass auch in städtischen Habitats ein Risiko besteht potentiell mit Erregern zeckenübertragener Krankheiten in Kontakt zu kommen.

7 Zusammenfassung

Als ein vom Menschen stark beeinflusstes und freizeitlich genutztes Ökosystem sind städtische Grünflächen in Hinblick auf zeckenübertragene Krankheiten von besonderem wissenschaftlichem Interesse. Zu diesem Zweck wurden Zecken monatlich über zwei Jahre in insgesamt neun verschiedenen Parks in fünf bayerischen Städten mit der Flaggmethode gesammelt und die Zeckendichte (Adulte und Nymphen/100m²) ermittelt. Neun Standorte wurden 2009 mittels spezifischer konventioneller und real-time PCRs auf die Anwesenheit von DNA von *Babesia* spp., *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. und *Bartonella* spp. untersucht sowie fünf ausgewählte Standorte zusätzlich auf *Babesia* spp. und *A. phagocytophilum* in 2010. Speziesdifferenzierungen wurden mittels Sequenzanalyse und Abgleich der amplifizierten PCR-Produkte mit der GenBank vorgenommen. Es wurden insgesamt 13.403 *I. ricinus* sowie jeweils eine *I. frontalis* und *I. hexagonus* gefangen. Die Zeckendichte variierte zwischen 15 - 53 Zecken/100m² in 2009 bzw 15 - 35 Zecken/100m² in 2010 abhängig vom untersuchten Standort. Eine Stichprobe von 6.593 Zecken (5.569 für *A. phagocytophilum*) wurde untersucht mit folgenden Ergebnissen: *Babesia* spp. (2009: 0,4% mit einem Larvenpool (Lp) à 2 Larven; 2010: 0,5-0,7% mit einem Lp à 5 Larven); *A. phagocytophilum* (2009: 9,5%; 2010: 6,6%); *Rickettsia* spp. (2009: 6,4-7,7% mit 76 Larven in 16 Lps). Sequenzanalysen ergaben die Anwesenheit von *Babesia* sp. EU1 (n= 25), *B. divergens* (n= 1), *B. divergens/capreoli* (n= 1), *B. gibsoni*-like (n= 1), *R. helvetica* (n= 272), *R. monacensis* strain IrR/Munich (n= 12) und *R. monacensis* (n= 1). Die Anwesenheit von *Bartonella* spp konnte nicht nachgewiesen werden. Coinfektionen wurden in 0,7% aller untersuchten Zecken in 2009 festgestellt. Eine weiterführende Analyse positiver *A. phagocytophilum*-Proben bezüglich des *16S rRNA*-Gens ergab sechs verschiedene Sequenzvarianten, von welchen schon zwei mit Erkrankungsfällen im Menschen assoziiert wurden. Prävalenzschwankungen zwischen Jahren und Standorten sowie ein außergewöhnliches Speziesauftreten von *Babesia* spp. zeigen, dass das Vorkommen von zeckenübertragenen Pathogenen von einer Vielzahl biotischen und abiotischen Faktoren abhängig sein kann und das Habitat „Stadtspark“ dabei eine besondere Stellung einnimmt.

8 Summary

Public parks are habitats of special scientific interest with regard to tick-borne pathogens because of the influence of man and the recreational value of parks in cities. Over two years ticks were collected monthly with the flagging method in nine different public parks in five Bavarian cities. The tick abundance (adults and nymphs/100m²) was additionally determined for every sampling. In 2009, nine sampling sites were screened for DNA of *Babesia* spp., *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. and *Babesia* spp. by specific conventional and real-time PCR and in 2010 five selected sites were screened for DNA of *Babesia* spp. and *A. phagocytophilum*. Species identification was performed by sequence analysis and alignment with existing sequences in GenBank. A total of 13,403 *I. ricinus*, one *I. frontalis* as well as one *I. hexagonus* were collected. The tick abundance varied between 15 - 53 ticks/100m² in 2009 and 15 - 35 ticks/100m² in 2010 depending on the sampling site. 6,593 ticks (5,569 for *A. phagocytophilum*) were investigated with the following results: *Babesia* spp. (2009: 0,4% with one pool of larvae à 2 larvae; 2010: 0,5-0,7% with one pool of larvae à 5 larvae); *A. phagocytophilum* (2009: 9,5%; 2010: 6,6%); *Rickettsia* spp. (2009: 6,4 - 7,7% with 16 pools of larvae including 76 larvae). Sequence analysis revealed *Babesia* sp. EU1 (n= 25), *B. divergens* (n= 1), *B. divergens/capreoli* (n= 1), *B. gibsoni*-like (n= 1), *R. helvetica* (n= 272), *R. monacensis* strain IrR/Munich (n= 12) and *R. monacensis* (n= 1). The occurrence of DNA of *Bartonella* spp. in *I. ricinus* could not be demonstrated. Coinfections were detected in 0.7% of all investigated ticks in 2009. *16S rRNA* gene analysis of *A. phagocytophilum* revealed six different genetic variants, of which two were 100% identical to known sequences in humans. Prevalence variation between the years and sampling sites as well as a noticeable species arrangement of *Babesia* spp. in public parks showed that the occurrence of tick-borne pathogens depends on different biotic and abiotic factors. Thereby the city park as habitat for ticks seems to take an eminent position on tick-borne pathogen topics.

9 Literaturverzeichnis

Alberdi, M.P., Walker, A.R., Urquhart, K.A., 2000. Field evidence that roe deer (*Capreolus capreolus*) are a natural host for *Ehrlichia phagocytophila*. Epidemiol. Infect. 124, 315-323.

Alberti, A., Zobba, R., Chessa, B., Addis, M.F., Sparagano, O., Pinna Parpaglia, M.L., Cubeddu, T., Pintori, G., Pittau, M., 2005. Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. Appl. Environ. Microbiol. 71, 6418-6422.

Alekseev, A.N., Dubinina, H.V., Semenov, A.V., Bolshakov, C.V., 2001. Evidence of ehrlichiosis agents found in ticks (Acari: Ixodidae) collected from migratory birds. J. Med. Entomol. 38, 471-474.

Allsopp, M.T., Allsopp, B.A., 2006. Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1081, 509-517.

Anderson, B.E., Neuman, M.A., 1997. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. Clin. Microbiol. Rev. 10, 203-219.

Angelakis, E., Billeter, S.A., Breitschwerdt, E.B., Chomel, B.B., Raoult, D., 2010. Potential for tick-borne bartonellosis. Emerg. Infect. Dis. 16, 385-391.

Bakken, J.S., Dumler, J.S., 2000. Human granulocytic ehrlichiosis. Clin. Infect. Dis. 31, 554-560.

Barandika, J.F., Hurtado, A., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., 2010. Seasonal dynamics of *Ixodes ricinus* in a 3-year period in northern Spain: first survey on the presence of tick-borne encephalitis virus. Vector Borne Zoonotic Dis. 10,

1027-1035.

Barutzki, D., De Nicola, A., Zeziola, M., Reule, M., 2006. Seroprävalenz der *Anaplasma phagocytophilum*-Infektion bei Hunden in Deutschland. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 119, 342-347.

Baumgarten, B.U., Röllinghoff, M., Bogdan, C., 1999. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks from southern Germany. J. Clin. Microbiol. 37, 3448-3451.

Beck, R., Vojta, L., Mrljak, V., Marinculić, A., Beck, A., Živičnjak, T., Cacciò, S.M., 2009. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. Int. J. Parasitol. 39, 843-848.

Belongia, E.A., 2002. Epidemiology and impact of coinfections acquired from *Ixodes* ticks. Vector Borne Zoonotic Dis. 2, 265-273.

Beninati, T., Lo, N., Noda, H., Esposito, F., Rizzoli, A., Favia, G., Genchi, C., 2002. First detection of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* from Italy. Emerg. Infect. Dis. 8, 983-986.

Bermann, F., Davoust, B., Fournier, P.E., Brisou-Lapointe, A.V., Brouqui, P., 2002. Ehrlichia equi (*Anaplasma phagocytophila*) infection in an adult horse in France. Vet. Rec. 150, 787-788.

Bertolotti, L., Tomassone, L., Tramuta, C., Grego, E., Amore, G., Ambrogi, C., Nebbia, P., Mannelli, A., 2006. *Borrelia lusitaniae* and spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Tuscany, central Italy. J. Med. Entomol. 43, 159-165.

Billeter, S.A., Levy, M.G., Chomel, B.B., Breitschwerdt, E.B., 2008. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick

transmission. Med. Vet. Entomol. 22, 1-15.

Birtles, R.J., 2005. Bartonellae as elegant hemotropic parasites. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1063, 270-279.

Bjöersdorff, A., Bergström, S., Massung, R.F., Haemig, P.D., Olsen, B., 2001. Ehrlichia-infected ticks on migrating birds. Emerg. Infect. Dis. 7, 877-879.

Blanco, J.R., Oteo, J.A., 2002. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. Clin. Microbiol. Infect. 8, 763-772.

Blaschitz, M., Narodoslavsky-Gföller, M., Kanzler, M., Stanek, G., Walochnik, J., 2008a. Babesia species occurring in Austrian Ixodes ricinus ticks. Appl. Environ. Microbiol. 74, 4841-4846.

Blaschitz, M., Narodoslavsky-Gföller, M., Kanzler, M., Walochnik, J., Stanek, G., 2008b. First detection of Rickettsia helvetica in Ixodes ricinus ticks in Austria. Vector Borne Zoonotic Dis. 8, 561-563.

Bonnet, S., Jouglin, M., L'Hostis, M., Chauvin, A., 2007a. Babesia sp. EU1 from roe deer and transmission within Ixodes ricinus. Emerg. Infect. Dis. 13, 1208-1210.

Bonnet, S., Jouglin, M., Malandrin, L., Becker, C., Agoulon, A., L'Hostis, M., Chauvin, A., 2007b. Transstadial and transovarial persistence of Babesia divergens DNA in Ixodes ricinus ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. Parasitology 134, 197-207.

Bonnet, S., Brisseau, N., Hermouet, A., Jouglin, M., Chauvin, A., 2009. Experimental in vitro transmission of Babesia sp. (EU1) by Ixodes ricinus. Vet. Rec. 40, 21.

Boretti, F.S., Perreten, A., Meli, M.L., Cattori, V., Willi, B., Wengi, N., Hornok, S., Honegger, H., Heggin, D., Woelfel, R., Reusch, C.E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2009. Molecular Investigations of *Rickettsia helvetica* infection in dogs, foxes, humans, and *Ixodes* ticks. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3230-3237.

Bouyer, D.H., Stenos, J., Crocquet-Valdes, P., Moron, C.G., Popov, V.L., Zavala-Velazquez, J.E., Foil, L.D., Stothard, D.R., Azad, A.F., Walker, D.H., 2001. *Rickettsia felis*: molecular characterization of a new member of the spotted fever group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 339-347.

Bown, K.J., Begon, M., Bennett, M., Woldehiwet, Z., Ogden, N.H., 2003. Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 63-70.

Bown, K.J., Lambin, X., Ogden, N.H., Begon, M., Telford, G., Woldehiwet, Z., Birtles, R.J., 2009. Delineating *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in coexisting, discrete enzootic cycles. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1948-1954.

Bown, K.J., Lambin, X., Telford, G., Heyder-Bruckner, D., Ogden, N.H., Birtles, R.J., 2011. The Common Shrew (*Sorex araneus*): A Neglected Host of Tick-Borne Infections? *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 947-953.

Breitschwerdt, E.B., Kordick, D.L., 2000. Bartonella infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 428-438.

Brenner, D.J., O'Connor, S.P., Winkler, H.H., Steigerwalt, A.G., 1993. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 777-786.

Burgdorfer, W., Aeschlimann, A., Peter, O., Hayes, S.F., Philip, R.N., 1979. *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. Acta Trop. 36, 357-367.

Butler, C.M., Nijhof, A.M., Jongejan, F., van der Kolk, J.H., 2008. *Anaplasma phagocytophilum* infection in horses in the Netherlands. Vet. Rec. 162, 216-217.

Casati, S., Sager, H., Gern, L., Piffaretti, J.C., 2006. Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. Ann. Agric. Environ. Med. 13, 65-70.

Cassini, R., Bonoli, C., Montarsi, F., Tessarin, C., Marcer, F., Galuppi, R., 2010. Detection of *Babesia* EU1 in *Ixodes ricinus* ticks in northern Italy. Vet. Parasitol. 171, 151-154.

Chen, S.M., Dumler, J.S., Bakken, J.S., Walker, D.H., 1994. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. J. Clin. Microbiol. 32, 589-595.

Chomel, B.B., Boulouis, H.J., Maruyama, S., Breitschwerdt, E.B., 2006. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. Emerg. Infect. Dis. 12, 389-394.

Chomel, B.B., Boulouis, H.J., Breitschwerdt, E.B., Kasten, R.W., Vayssier-Taussat, M., Birtles, R.J., Koehler, J.E., Dehio, C., 2009. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. Vet. Rec. 40, 29.

Christova, I., Schouls, L., van De Pol, I., Park, J., Panayotov, S., Lefterova, V., Kantardjiev, T., Dumler, J.S., 2001. High prevalence of granulocytic *Ehrlichiae* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Bulgaria. J. Clin. Microbiol. 39, 4172-4174.

Christova, I., Van De Pol, J., Yazar, S., Velo, E., 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, 535-542.

Chung, C.Y., Kasten, R.W., Paff, S.M., Van Horn, B.A., Vayssier-Taussat, M., Boulouis, H.J., Chomel, B.B., 2004. *Bartonella* spp. DNA associated with biting flies from California. Emerg. Infect. Dis. 10, 1311-1313.

Ciceroni, L., Pinto, A., Ciarrocchi, S., Ciervo, A., 2006. Current knowledge of rickettsial diseases in Italy. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1078, 143-149.

Cieniuch, S., Stańczyk, J., Ruczaj, A., 2009. The first detection of *Babesia* EU1 and *Babesia canis canis* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) collected in urban and rural areas in northern Poland. Pol. J. Microbiol. 58, 231-236.

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

Clopper, C., Pearson, E., 1934. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. Biometrika 26, 404-413.

Comer, J.A., Paddock, C.D., Childs, J.E., 2001. Urban zoonoses caused by *Bartonella*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, and *Rickettsia* species. Vector Borne Zoonotic Dis. 1, 91-118.

Conrad, P.A., Kjemtrup, A.M., Carreno, R.A., Thomford, J., Wainwright, K., Eberhard, M., Quick, R., Telford, S.R., 3rd, Herwaldt, B.L., 2006. Description of *Babesia duncani* n.sp. (Apicomplexa: Babesiidae) from humans and its differentiation from other piroplasms. Int. J. Parasitol. 36, 779-789.

Cotté, V., Bonnet, S., Le Rhun, D., Le Naour, E., Chauvin, A., Boulouis, H.J., Lecuelle, B., Lilin, T., Vayssier-Taussat, M., 2008. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1074-1080.

Cotté, V., Bonnet, S., Cote, M., Vayssier-Taussat, M., 2010. Prevalence of five pathogenic agents in questing *Ixodes ricinus* ticks from western France. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10, 723-730.

Courtney, J.W., Kostelnik, L.M., Zeidner, N.S., Massung, R.F., 2004. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3164-3168.

Criado-Fornelio, A., Gónzalez-del-Río, M.A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, J.C., 2003a. Molecular characterization of a *Babesia gibsoni* isolate from a Spanish dog. *Vet. Parasitol.* 117, 123-129.

Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, J.C., 2003b. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Vet. Parasitol.* 114, 173-194.

Daniel, M., Kříz, B., Valter, J., Kott, I., Danielová, V., 2008. The influence of meteorological conditions of the preceding winter on the incidences of tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in the Czech Republic. *Int. J. Med. Microbiol.* 298, 60-67.

Dautel, H., Dippel, C., Kämmer, D., Werkhausen, A., Kahl, O., 2008. Winter activity of *Ixodes ricinus* in a Berlin forest. *Int. J. Med. Microbiol.* 298, 50-54.

de Carvalho, I.L., Milhano, N., Santos, A.S., Almeida, V., Barros, S.C., De Sousa, R., Nuncio, M.S., 2008. Detection of *Borrelia lusitaniae*, *Rickettsia* sp. IRS3, *Rickettsia monacensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* collected in Madeira Island, Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 575-579.

de la Fuente, J., Massung, R.F., Wong, S.J., Chu, F.K., Lutz, H., Meli, M., von Loewenich, F.D., Grzeszczuk, A., Torina, A., Caracappa, S., Mangold, A.J., Naranjo, V., Stuen, S., Kocan, K.M., 2005. Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. J. Clin. Microbiol. 43, 1309-1317.

Derdáková, M., Halánová, M., Stanko, M., Štefančíková, A., Čisláková, L., Pet'ko, B., 2003. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from eastern Slovakia. Ann. Agric. Environ. Med. 10, 269-271.

Dickman, C.R., Doncaster, C.P., 1987. The Ecology of Small Mammals in Urban Habitats. I. Populations in a Patchy Environment. J. Anim. Ecol. 56, 629-640.

Dobler, G., Essbauer, S., Wölfel, R., 2009. Isolation and preliminary characterisation of '*Rickettsia monacensis*' in south-eastern Germany. Clin. Microbiol. Infect. 15 Suppl 2, 263-264.

Dobler, G., Wölfel, R., 2009. Fleckfieber und andere Rickettsiosen, Alte und neu auftretende Infektionen in Deutschland. Dtsch. Arztebl. Int. 106, 348-354.

Dobson, A., Taylor, J., Randolph, S.E., 2011. Tick (*Ixodes ricinus*) abundance and seasonality at recreational sites in the UK: Hazards in relation to fine-scale habitat types revealed by complementary sampling methods. Ticks Tick-borne Dis. 2, 67-74.

Doudier, B., Olano, J., Parola, P., Brouqui, P., 2010. Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* spp. as human pathogens. Vet. Parasitol. 167, 149-154.

Duh, D., Petrovec, M., Avsic-Zupanc, T., 2001. Diversity of *Babesia* Infecting European sheep ticks (*Ixodes ricinus*). J. Clin. Microbiol. 39, 3395-3397.

Duh, D., Petrovec, M., Avsic-Zupanc, T., 2005a. Molecular characterization of human pathogen *Babesia* EU1 in *Ixodes ricinus* ticks from Slovenia. J. Parasitol. 91, 463-465.

Duh, D., Petrovec, M., Bidovec, A., Avsic-Zupanc, T., 2005b. Cervids as Babesiae hosts, Slovenia. Emerg. Infect. Dis. 11, 1121-1123.

Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 2145-2165.

Dumler, J.S., Choi, K.S., Garcia-Garcia, J.C., Barat, N.S., Scorpio, D.G., Garyu, J.W., Grab, D.J., Bakken, J.S., 2005. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. Emerg. Infect. Dis. 11, 1828-1834.

Dumler, J.S., Madigan, J.E., Pusterla, N., Bakken, J.S., 2007. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. Clin. Infect. Dis. 45 Suppl 1, 45-51.

Eckert, J., Friedhoff, K.T., Zahner, H., Deplazes, P., 2008. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin, 2.Aufl. Edition. Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart.

Fingerle, V., Goodman, J.L., Johnson, R.C., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., Wilske, B., 1997. Human granulocytic ehrlichiosis in southern Germany: increased seroprevalence in high-risk groups. J. Clin. Microbiol. 35, 3244-3247.

Fingerle, V., Munderloh, U.G., Liegl, G., Wilske, B., 1999. Coexistence of ehrlichiae of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*

from Southern Germany. Med. Microbiol. Immunol. 188, 145-149.

Foppa, I.M., Krause, P.J., Spielman, A., Goethert, H., Gern, L., Brand, B., Telford, S.R., 3rd, 2002. Entomologic and serologic evidence of zoonotic transmission of *Babesia microti*, eastern Switzerland. Emerg. Infect. Dis. 8, 722-726.

Fournier, P.E., Allombert, C., Supputamongkol, Y., Caruso, G., Brouqui, P., Raoult, D., 2004. An eruptive fever associated with antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand. J. Clin. Microbiol. 42, 816-818.

Fournier, P.E., Raoult, D., 2009. Current knowledge on phylogeny and taxonomy of *Rickettsia* spp. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1166, 1-11.

Franke, J., Fritsch, J., Tomaso, H., Straube, E., Dorn, W., Hildebrandt, A., 2010a. Co-existence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat of Central Germany. Appl. Environ. Microbiol. 76, 6829-6836.

Franke, J., Meier, F., Moldenhauer, A., Straube, E., Dorn, W., Hildebrandt, A., 2010b. Established and emerging pathogens in *Ixodes ricinus* ticks collected from birds on a conservation island in the Baltic Sea. Med. Vet. Entomol. 24, 425-432.

Gardiner, W.P., Gettinby, G., 1983. A weather-based prediction model for the life-cycle of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. Vet. Parasitol. 13, 77-84.

Gigandet, L., Stauffer, E., Douet, V., Rais, O., Moret, J., Gern, L., 2011. Prevalence of Three Zoonotic Babesia Species in *Ixodes ricinus* (Linne, 1758) Nymphs in a Suburban Forest in Switzerland. Vector Borne Zoonotic Dis. 11, 363-366.

Gray, J., von Stedingk, L.V., Gürtelschmid, M., Granström, M., 2002. Transmission studies of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks and gerbils. J. Clin. Microbiol. 40, 1259-1263.

Gray, J., Zintl, A., Hildebrandt, A., Hunfeld, K.-P., Weiss, L., 2010. Zoonotic babesiosis: Overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. Ticks Tick-borne Dis. 1, 3-10.

Gray, J.S., 2006. Identity of the causal agents of human babesiosis in Europe. Int. J. Med. Microbiol. 296 Suppl 40, 131-136.

Gray, J.S., Dautel, H., Estrada-Peña, A., Kahl, O., Lindgren, E., 2009. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. 2009, Article ID 593232.

Grzeszczuk, A., Stańczak, J., Kubica-Biernat, B., 2002. Serological and molecular evidence of human granulocytic ehrlichiosis focus in the Białowieża Primeval Forest (Puszcza Białowieska), northeastern Poland. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 21, 6-11.

Grzeszczuk, A., Stańczak, J., 2006a. Highly variable year-to-year prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in northeastern Poland: a 4-year follow-up. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1078, 309-311.

Grzeszczuk, A., Stańczak, J., 2006b. High prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in ticks removed from human skin in north-eastern Poland. Ann. Agric. Environ. Med. 13, 45-48.

Guy, E., Tasker, S., Joynson, D.H., 1998. Detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis (HGE) in UK ticks using polymerase chain reaction. Epidemiol. Infect. 121, 681-683.

Guyot, H., Ramery, E., O'Grady, L., Sandersen, C., Rollin, F., 2011. Emergence of bovine ehrlichiosis in Belgian cattle herds. *Ticks Tick-borne Dis.* 2, 116-118.

Halos, L., Jamal, T., Maillard, R., Beugnet, F., Le Menach, A., Boulouis, H.J., Vayssier-Taussat, M., 2005. Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* sp. *Vet. Rec.* 36, 79-87.

Halos, L., Vourc'h, G., Cotte, V., Gasqui, P., Barnouin, J., Boulouis, H.J., Vayssier-Taussat, M., 2006. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* sp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in questing *Ixodes ricinus* ticks from France. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 316-319.

Halos, L., Bord, S., Cotté, V., Gasqui, P., Abrial, D., Barnouin, J., Boulouis, H.J., Vayssier-Taussat, M., Vourc'h, G., 2010. Ecological factors characterizing the prevalence of bacterial tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in pastures and woodlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4413-4420.

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

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

Hartelt, K., Pluta, S., Oehme, R., Kimmig, P., 2008. Spread of ticks and tick-borne diseases in Germany due to global warming. *Parasitol. Res.* 103 Suppl 1, 109-116.

Heikkilä, H.M., Bondarenko, A., Mihalkov, A., Pfister, K., Spillmann, T.,

2010. *Anaplasma phagocytophilum* infection in a domestic cat in Finland: Case report. Acta Vet. Scand. 52, 62.

Hellwig, B., Langbein-Detsch, I., Hübner, J., Hach, V., 2009. Übertragung der Babesiose bei einem Hund Fallbericht. Praktischer Tierarzt 90, 296-302.

Hercík, K., Hášová, V., Janeček, J., Branny, P., 2007. Molecular evidence of *Bartonella* DNA in ixodid ticks in Czechia. Folia Microbiol. (Praha) 52, 503-509.

Herwaldt, B., Persing, D.H., Précigout, E.A., Goff, W.L., Mathiesen, D.A., Taylor, P.W., Eberhard, M.L., Gorenflot, A.F., 1996. A fatal case of babesiosis in Missouri: identification of another piroplasm that infects humans. Ann. Intern. Med. 124, 643-650.

Herwaldt, B.L., Cacciò, S., Gherlinzoni, F., Aspöck, H., Slemenda, S.B., Piccaluga, P., Martinelli, G., Edelhofer, R., Hollenstein, U., Poletti, G., Pampiglione, S., Löschenberger, K., Tura, S., Pieniazek, N.J., 2003. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. Emerg. Infect. Dis. 9, 942-948.

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

Hildebrandt, A., Tenter, A.M., Straube, E., Hunfeld, K.-P., 2008. Human babesiosis in Germany: Just overlooked or truly new? Int. J. Med. Microbiol. 298, 336-346.

Hildebrandt, A., Fritsch, J., Franke, J., Sachse, S., Dorn, W., Straube, E., 2010a. Co-circulation of Emerging Tick-Borne Pathogens in Middle Germany. Vector Borne Zoonotic Dis. 11, 533-537.

Hildebrandt, A., Krämer, A., Sachse, S., Straube, E., 2010b. Detection of *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia). Ticks Tick-borne Dis. 1, 52-56.

Hildebrandt, A., Pauliks, K., Sachse, S., Straube, E., 2010c. Coexistence of *Borrelia* spp. and *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* Ticks in Middle Germany. Vector Borne Zoonotic Dis. 10, 831-837.

Hillyard, P.D., 1996. Ticks of North-West Europe, Synopses of the British Fauna No. 52. The Linnean Society of London, London.

Hilpertshauer, H., Deplazes, P., Schnyder, M., Gern, L., Mathis, A., 2006. *Babesia* spp. identified by PCR in ticks collected from domestic and wild ruminants in southern Switzerland. Appl. Environ. Microbiol. 72, 6503-6507.

Holman, M.S., Caporale, D.A., Goldberg, J., Lacombe, E., Lubelczyk, C., Rand, P.W., Smith, R.P., 2004. *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia microti*, and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes scapularis*, southern coastal Maine. Emerg. Infect. Dis. 10, 744-746.

Holman, P.J., 2006. Phylogenetic and biologic evidence that *Babesia divergens* is not endemic in the United States. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1081, 518-525.

Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S.R., 3rd, Krause, P.J., Persing, D.H., 2000. Babesiosis. Clin. Microbiol. Rev. 13, 451-469.

Hulínská, D., Langrová, K., Pejčoch, M., Pavlásek, I., 2004. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in animals by real-time polymerase chain reaction. APMIS 112, 239-247.

Hunfeld, K.P., Brade, V., 1999. Prevalence of antibodies against the human granulocytic ehrlichiosis agent in Lyme borreliosis patients from Germany. Eur. J.

Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18, 221-224.

Hunfeld, K.P., Hildebrandt, A., Gray, J.S., 2008. Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *Int. J. Parasitol.* 38, 1219-1237.

Irwin, P.J., 2009. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit. Vectors* 2 Suppl 1, 4.

Jacomo, V., Kelly, P.J., Raoult, D., 2002. Natural history of Bartonella infections (an exception to Koch's postulate). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 8-18.

Jado, I., Oteo, J.A., Aldámiz, M., Gil, H., Escudero, R., Ibarra, V., Portu, J., Portillo, A., Lezaun, M.J., García-Amil, C., Rodríguez-Moreno, I., Anda, P., 2007. *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1405-1407.

Jensen, J., Simon, D., Murua Escobar, H., Soller, J.T., Bullerdiek, J., Beelitz, P., Pfister, K., Nolte, I., 2007. *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Zoonoses Public Health* 54, 94-101.

Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology* 129 Suppl, 3-14.

Junttila, J., Peltomaa, M., Soini, H., Marjamäki, M., Viljanen, M.K., 1999. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in urban recreational areas of Helsinki. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1361-1365.

Kalsbeek, V., Frandsen, F., 1996. The seasonal activity of *Ixodes ricinus* ticks in Denmark. *Anz. Schädlingskde., Pflanzenschutz, Umweltschutz* 69, 160-161.

Kantsø, B., Bo Svendsen, C., Moestrup Jensen, P., Vennestrøm, J., Krogfelt, K.A., 2010. Seasonal and habitat variation in the prevalence of *Rickettsia*

helvetica in *Ixodes ricinus* ticks from Denmark. Ticks Tick-borne Dis. 1, 101-103.

Karbowiak, G., 2004. Zoonotic reservoir of *Babesia microti* in Poland. Pol. J. Microbiol. 53 Suppl, 61-65.

Katargina, O., Geller, J., Alekseev, A., Dubinina, H., Efremova, G., Mishaeva, N., Vasilenko, V., Kuznetsova, T., Järvekülg, L., Vene, S., Lundkvist, A., Golovljova, I., 2011a. Identification of *Anaplasma phagocytophilum* in tick populations in Estonia, European Part of Russia and Belarus. Clin. Microbiol. Infect. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03457.

Katargina, O., Geller, J., Vasilenko, V., Kuznetsova, T., Järvekülg, L., Vene, S., Lundkvist, A., Golovljova, I., 2011b. Detection and Characterization of *Babesia* Species in *Ixodes* Ticks in Estonia. Vector Borne Zoonotic Dis. 11, 923-928.

Keesing, F., Belden, L.K., Daszak, P., Dobson, A., Harvell, C.D., Holt, R.D., Hudson, P., Jolles, A., Jones, K.E., Mitchell, C.E., Myers, S.S., Bogich, T., Ostfeld, R.S., 2010. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. Nature 468, 647-652.

Kempf, V.A., Krämer, F., 2008. The role of *Bartonella* spp. in veterinary and human medicine with special emphasis on pathogenicity mechanisms. EJCAP 18, 274-279.

Kjemtrup, A.M., Conrad, P.A., 2000. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. Int. J. Parasitol. 30, 1323-1337.

Kjemtrup, A.M., Conrad, P.A., 2006. A review of the small canine piroplasms from California: *Babesia conradae* in the literature. Vet. Parasitol. 138, 112-117.

Knap, N., Durmiši, E., Saksida, A., Korva, M., Petrovec, M., Avšič-Županc,

T., 2009. Influence of climatic factors on dynamics of questing *Ixodes ricinus* ticks in Slovenia. *Vet. Parasitol.* 164, 275-281.

Koči, J., Movila, A., Taragel'ová, V., Toderas, I., Uspenskaia, I., Derdákóvá, M., Labuda, M., 2007. First report of *Anaplasma phagocytophilum* and its co-infections with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) from Republic of Moldova. *Exp. Appl. Acarol.* 41, 147-152.

Kohn, B., Galke, D., Beelitz, P., Pfister, K., 2008. Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 22, 1289-1295.

Kohn, B., Silaghi, C., Galke, D., Arndt, G., Pfister, K., 2010. Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Res. Vet. Sci.* 91, 71-76.

Kolonin, G.V., 2009. Fauna of Ixodid Ticks of the World (Acari, Ixodidae). Moscow. <http://www.kolonin.org>

Korenberg, E.I., 2000. Seasonal Population Dynamics of *Ixodes* Ticks and Tick-Borne Encephalitis Virus. *Exp. Appl. Acarol.* 24, 665-681.

Kowalski, J., Hopfenmüller, W., Fingerle, V., Malberg, H., Eisenblätter, M., Wagner, J., Miksits, K., Hahn, H., Ignatius, R., 2006. Seroprevalence of human granulocytic anaplasmosis in Berlin/Brandenburg, Germany: an 8-year survey. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 924-927.

Kupča, A., 2009. *Ixodes ricinus* (Ixodidae): Saisonale Aktivität und natürliche Infektionen mit dem FSME-Virus an ausgewählten Standorten in Bayern. Doktorarbeit. Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Kurtenbach, K., De Michelis, S., Etti, S., Schafer, S.M., Sewell, H.S., Brade, V., Kraiczy, P., 2002. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato--the

key role of host complement. Trends Microbiol. 10, 74-79.

Kuźna-Grygiel, W., Bukowska, K., Cichocka, A., Kosik-Bogacka, D., Skotarczak, B., 2002. The prevalence of piroplasms in a population of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) from north-western Poland. Ann. Agric. Environ. Med. 9, 175-178.

Kybicová, K., Schánilec, P., Hulínská, D., Uherková, L., Kurzová, Z., Spejchalová, S., 2009. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs in the Czech Republic. Vector Borne Zoonotic Dis. 9, 655-661.

Langton, C., Gray, J.S., Waters, P.F., Holman, P.J., 2003. Naturally acquired babesiosis in a reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) herd in Great Britain. Parasitol. Res. 89, 194-198.

Leonhard, S., 2005. Untersuchungen zur Häufigkeit von *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* und *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* aus Bayern und Baden-Württemberg. Doktorarbeit. Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Leutenegger, C.M., Pusterla, N., Mislin, C.N., Weber, R., Lutz, H., 1999. Molecular evidence of coinfection of ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and the human granulocytic ehrlichiosis agent in Switzerland. J. Clin. Microbiol. 37, 3390-3391.

Levin, M.L., Fish, D., 2001. Interference between the agents of Lyme disease and human granulocytic ehrlichiosis in a natural reservoir host. Vector Borne Zoonotic Dis. 1, 139-148.

Liz, J.S., Anderes, L., Sumner, J.W., Massung, R.F., Gern, L., Rutti, B., Brossard, M., 2000. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. J. Clin. Microbiol. 38,

1002-1007.

Lucius, R., Loos-Frank, B., 2008. Biologie von Parasiten, 2. Aufl. Edition. Springer Verlag, Heidelberg.

Magalhães, R.F., Pitassi, L.H., Salvadego, M., de Moraes, A.M., Barjas-Castro, M.L., Velho, P.E., 2008. *Bartonella henselae* survives after the storage period of red blood cell units: is it transmissible by transfusion? *Transfus. Med.* 18, 287-291.

Maggi, R.G., Breitschwerdt, E.B., 2005. Potential limitations of the 16S-23S rRNA intergenic region for molecular detection of *Bartonella* species. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1171-1176.

Maggi, R.G., Diniz, P.P., Cadenas, M.B., Breitschwerdt, E.B., 2006. The Use of Molecular diagnostic Techniques to detect *Anaplasma*, *Bartonella* and *Ehrlichia* Species in Arthropods or Patients. In: The International Canine Vector-Borne Disease Symposium, Billesley, Alcester, UK, April 18th-20th, 2006, 9-14.

Mantelli, B., Pecchioli, E., Hauffe, H.C., Rosá, R., Rizzoli, A., 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Anaplasma phagocytophilum* in the wood tick *Ixodes ricinus* in the Province of Trento, Italy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25, 737-739.

Massung, R.F., Slater, K., Owens, J.H., Nicholson, W.L., Mather, T.N., Solberg, V.B., Olson, J.G., 1998. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1090-1095.

Matsumoto, K., Joncour, G., Davoust, B., Pitel, P.H., Chauzy, A., Collin, E., Morvan, H., Vassallo, N., Brouqui, P., 2006. *Anaplasma phagocytophilum* infection in cattle in France. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 491-494.

Milutinović, M., Masuzawa, T., Tomanović, S., Radulović, Z., Fukui, T., Okamoto, Y., 2008. *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* and their co-infections in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks collected in Serbia. *Exp. Appl. Acarol.* 45, 171-183.

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

Movila, A., Reye, A.L., Dubinina, H.V., Tolstenkov, O.O., Toderas, I., Hübschen, J.M., Muller, C.P., Alekseev, A.N., 2011. Detection of *Babesia* Sp. EU1 and members of spotted fever group rickettsiae in ticks collected from migratory birds at Curonian Spit, North-Western Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 89-91.

Munderloh, U.G., Lynch, M.J., Herron, M.J., Palmer, A.T., Kurtti, T.J., Nelson, R.D., Goodman, J.L., 2004. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Vet. Microbiol.* 101, 53-64.

Nilsson, K., Jaenson, T.G., Uhnö, I., Lindquist, O., Pettersson, B., Uhlén, M., Friman, G., Pålson, C., 1997. Characterization of a spotted fever group Rickettsia from *Ixodes ricinus* ticks in Sweden. *J. Clin. Microbiol.* 35, 243-247.

Nilsson, K., Lindquist, O., Liu, A.J., Jaenson, T.G., Friman, G., Pålson, C., 1999a. *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in Sweden. *J. Clin. Microbiol.* 37, 400-403.

Nilsson, K., Lindquist, O., Pålson, C., 1999b. Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet* 354, 1169-1173.

Nilsson, K., Elfving, K., Pålson, C., 2010. *Rickettsia helvetica* in patient with

meningitis, Sweden, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 490-492.

Oehme, R., Hartelt, K., Backe, H., Brockmann, S., Kimmig, P., 2002. Foci of tick-borne diseases in southwest Germany. *Int. J. Med. Microbiol.* 291 Suppl 33, 22-29.

Ogden, N.H., Bown, K., Horrocks, B.K., Woldehiwet, Z., Bennett, M., 1998. Granulocytic *Ehrlichia* infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. *Med. Vet. Entomol.* 12, 423-429.

Parola, P., Beati, L., Cambon, M., Raoult, D., 1998. First isolation of *Rickettsia helvetica* from *Ixodes ricinus* ticks in France. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17, 95-100.

Parola, P., Raoult, D., 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin. Infect. Dis.* 32, 897-928.

Parola, P., 2004. Tick-borne rickettsial diseases: emerging risks in Europe. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 297-304.

Parola, P., Davoust, B., Raoult, D., 2005a. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet. Rec.* 36, 469-492.

Parola, P., Paddock, C.D., Raoult, D., 2005b. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 719-756.

Pauliks, K., 2009. Prävalenz von *Borrelia burgdorferi* sensu lato und *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus*-Zecken im Naherholungsgebiet Zeitgrund in Thüringen. Doktorarbeit. Friedrich-Schiller-Universität, Jena.

Petrovec, M., Lotric Furlan, S., Zupanc, T.A., Strle, F., Brouqui, P., Roux,

V., Dumler, J.S., 1997. Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. J. Clin. Microbiol. 35, 1556-1559.

Petrovec, M., Sumner, J.W., Nicholson, W.L., Childs, J.E., Strle, F., Barlič, J., Lotrič-Furlan, S., Avšič Županc, T., 1999. Identity of ehrlichial DNA sequences derived from *Ixodes ricinus* ticks with those obtained from patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. J. Clin. Microbiol. 37, 209-210.

Petrovec, M., Sixl, W., Schweiger, R., Mikulašek, S., Elke, L., Wüst, G., Marth, E., Strašek, K., Stünzner, D., Avšič-Županc, T., 2003. Infections of wild animals with *Anaplasma phagocytophila* in Austria and the Czech Republic. Ann. N. Y. Acad. Sci. 990, 103-106.

Pfister, K., Roesti, A., Boss, P.H., Balsiger, B., 1987. *Ehrlichia phagocytophilum* als Erreger des Weidefiebers im Berner Oberland. Schweiz. Arch. Tierheilk. 129, 343-347.

Piccolin, G., Benedetti, G., Doglioni, C., Lorenzato, C., Mancuso, S., Papa, N., Pitton, L., Ramon, M.C., Zasio, C., Bertiato, G., 2006. A study of the presence of *B. burgdorferi*, *Anaplasma* (previously *Ehrlichia*) *phagocytophilum*, *Rickettsia*, and *Babesia* in *Ixodes ricinus* collected within the territory of Belluno, Italy. Vector Borne Zoonotic Dis. 6, 24-31.

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

Pieniżek, N., Sawczuk, M., Skotarczak, B., 2006. Molecular identification of *Babesia* parasites isolated from *Ixodes ricinus* ticks collected in northwestern Poland. J. Parasitol. 92, 32-35.

Podsiadly, E., Chmielewski, T., Sochon, E., Tylewska-Wierzbanowska, S., 2007. *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks removed from dogs. Vector

Borne Zoonotic Dis. 7, 189-192.

Polin, H., Hufnagl, P., Haunschmid, R., Gruber, F., Ladurner, G., 2004. Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and wild animals in Austria. J. Clin. Microbiol. 42, 2285-2286.

Prosenc, K., Petrovec, M., Trilar, T., Duh, D., Avšič Županc, T., 2003. Detection of rickettsiae in *Ixodes ricinus* ticks in Slovenia. Ann. N. Y. Acad. Sci. 990, 201-204.

Pusterla, N., Huder, J., Wolfensberger, C., Litschi, B., Parvis, A., Lutz, H., 1997. Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland. J. Clin. Microbiol. 35, 2307-2309.

Pusterla, N., Leutenegger, C.M., Huder, J.B., Weber, R., Braun, U., Lutz, H., 1999. Evidence of the human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland. J. Clin. Microbiol. 37, 1332-1334.

Radzijeuskaja, J., Paulauskas, A., Rosef, O., 2008. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia divergens* in *Ixodes ricinus* ticks from Lithuania and Norway. Int. J. Med. Microbiol. 298, 218-221.

Randolph, S.E., 2004. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. Parasitology 129 Suppl, 37-65.

Regnery, R.L., Spruill, C.L., Plikaytis, B.D., 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. J. Bacteriol. 173, 1576-1589.

Řeháček, J., Kocianová, E., Lukáčová, M., Stanek, G., Khanakah, G., Vyrosteková, V., Valková, D., 1997. Detection of spotted fever group (SFG)

rickettsia in *Ixodes ricinus* ticks in Austria. Acta Virol. 41, 355-356.

Reye, A.L., Hübschen, J.M., Sausy, A., Muller, C.P., 2010. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. Appl. Environ. Microbiol. 76, 2923-2931.

Richter, J., Fournier, P.E., Petridou, J., Haussinger, D., Raoult, D., 2002. *Rickettsia felis* infection acquired in Europe and documented by polymerase chain reaction. Emerg. Infect. Dis. 8, 207-208.

Rikihisa, Y., 1991. The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases. Clin. Microbiol. Rev. 4, 286-308.

Rommel, M., Eckert, J., Kutzer, E., Körting, W., Schnieder, T., 2000. Veterinärmedizinische Parasitologie, 5.Aufl. Edition. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, Wien.

Rosef, O., Radzijeuskaja, J., Paulauskas, A., Haslekås, C., 2009. The prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Norway. Clin. Microbiol. Infect. 15, 43-45.

Roux, V., Raoult, D., 2000. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*ompB*). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50 Pt 4, 1449-1455.

Rymaszewska, A., 2008. Divergence within the marker region of the *groESL* operon in *Anaplasma phagocytophilum*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 27, 1025-1036.

Sanogo, Y.O., Zeaiter, Z., Caruso, G., Merola, F., Shpynov, S., Brouqui, P., Raoult, D., 2003. *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodida) removed from humans, Belluno province, Italy. Emerg. Infect. Dis. 9, 329-332.

Santos, A.S., Santos-Silva, M.M., Almeida, V.C., Bacellar, F., Dumler, J.S., 2004. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in *Ixodes* ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Setubal District, mainland Portugal. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1643-1648.

Scarpulla, M., Caristo, M.E., Macri, G., Lillini, E., 2003. Equine ehrlichiosis in Italy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990, 259-263.

Schaarschmidt-Kiener, D., Graf, F., von Loewenich, F.D., Müller, W., 2009. *Anaplasma phagocytophilum* Infektion bei einer Katze in der Schweiz. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 151, 336-341.

Scharf, W., Schauer, S., Freyburger, F., Petrovec, M., Schaarschmidt-Kiener, D., Liebisch, G., Runge, M., Ganter, M., Kehl, A., Dumler, J.S., Garcia-Perez, A.L., Jensen, J., Fingerle, V., Meli, M.L., Ensser, A., Stuen, S., von Loewenich, F.D., 2011. Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum ankA* gene clusters. *J. Clin. Microbiol.* 49, 790-796.

Schouls, L.M., Van De Pol, I., Rijpkema, S.G., 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, 2215-2222.

Schülein, R., Seubert, A., Gille, C., Lanz, C., Hansmann, Y., Piémont, Y., Dehio, C., 2001. Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *J. Exp. Med.* 193, 1077-1086.

Schwarz, A., Maier, W.A., Kistemann, T., Kampen, H., 2009. Analysis of the distribution of the tick *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae) in a nature reserve of western Germany using Geographic Information Systems. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 212, 87-96.

Sen, E., Uchishima, Y., Okamoto, Y., Fukui, T., Kadosaka, T., Ohashi, N.,

Masuzawa, T., 2011. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Istanbul metropolitan area and rural Trakya (Thrace) region of north-western Turkey. Ticks Tick-borne Dis. 2, 94-98.

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

Silaghi, C., Gilles, J., Höhle, M., Fingerle, V., Just, F.T., Pfister, K., 2008a. *Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany. Emerg. Infect. Dis. 14, 972-974.

Silaghi, C., Gilles, J., Höhle, M., Pradel, I., Just, F.T., Fingerle, V., Küchenhoff, H., Pfister, K., 2008b. Prevalence of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in southern Germany. J. Med. Entomol. 45, 948-955.

Silaghi, C., Hamel, D., Thiel, C., Pfister, K., Passos, L.M., Rehbein, S., 2011a. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in wild caprine and cervid ungulates from the Alps in Tyrol, Austria. Vector Borne Zoonotic Dis. 11, 355-362.

Silaghi, C., Hamel, D., Thiel, C., Pfister, K., Pfeffer, M., 2011b. Spotted Fever Group Rickettsiae in Ticks, Germany. Emerg. Infect. Dis. 17, 890-892.

Silaghi, C., Liebisch, G., Pfister, K., 2011c. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases. Parasit Vectors 4, 161.

Simser, J.A., Palmer, A.T., Fingerle, V., Wilske, B., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., 2002. *Rickettsia monacensis* sp. nov., a spotted fever group Rickettsia, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in a European city park. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4559-4566.

Siński, E., Bajer, A., Welc, R., Pawelczyk, A., Ogrzewalska, M., Behnke, J.M., 2006. *Babesia microti*: prevalence in wild rodents and *Ixodes ricinus* ticks from the Mazury Lakes District of North-Eastern Poland. Int. J. Med. Microbiol. 296 Suppl 40, 137-143.

Sixl, W., Petrovec, M., Marth, E., Wüst, G., Stünzner, D., Schweiger, R., Avšič Županc, T., 2003. Investigation of *Anaplasma phagocytophila* infections in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks in Austria. Ann. N. Y. Acad. Sci. 990, 94-97.

Skarphéðinsson, S., Lyholm, B.F., Ljungberg, M., Søgaaard, P., Kolmos, H.J., Nielsen, L.P., 2007. Detection and identification of *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia helvetica* in Danish *Ixodes ricinus* ticks. APMIS 115, 225-230.

Skotarczak, B., Cichocka, A., 2001. Isolation and amplification by polymerase chain reaction DNA of *Babesia microti* and *Babesia divergens* in ticks in Poland. Ann. Agric. Environ. Med. 8, 187-189.

Skotarczak, B., Rymaszewska, A., Wodecka, B., Sawczuk, M., 2003. Molecular evidence of coinfection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, human granulocytic ehrlichiosis agent, and *Babesia microti* in ticks from northwestern Poland. J. Parasitol. 89, 194-196.

Skotarczak, B., Adamska, M., 2005. Detection of *Bartonella* DNA in roe deer (*Capreolus capreolus*) and in ticks removed from deer. Eur. J. Wildl. Res. 51, 287-290.

Skuballa, J., Petney, T., Pfäffle, M., Taraschewski, H., 2010. Molecular Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in the European Hedgehog (*Erinaceus europaeus*) and its Ticks. Vector Borne Zoonotic Dis. 10, 1055-1057.

Smetanová, K., Schwarzová, K., Kocianová, E., 2006. Detection of *Anaplasma*

phagocytophilum, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., and *Borrelia burgdorferi* s. l. in Ticks, and wild-living animals in western and middle Slovakia. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1078, 312-315.

Socolovschi, C., Mediannikov, O., Raoult, D., Parola, P., 2009. The relationship between spotted fever group *Rickettsiae* and ixodid ticks. Vet. Rec. 40, 34.

Sonenshine, D.E., 1991. Biology of ticks Vol 1. Oxford University Press, New York.

Sonenshine, D.E., 1993. Biology of ticks Vol 2. Oxford University Press, New York.

Sprong, H., Wielinga, P.R., Fonville, M., Reusken, C., Brandenburg, A.H., Borgsteede, F., Gaasenbeek, C., van der Giessen, J.W., 2009. *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. Parasit. Vectors 2, 41.

Stafford, K.C., 3rd, Massung, R.F., Magnarelli, L.A., Ijdo, J.W., Anderson, J.F., 1999. Infection with agents of human granulocytic ehrlichiosis, lyme disease, and babesiosis in wild white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) in Connecticut. J. Clin. Microbiol. 37, 2887-2892.

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

Stańczak, J., Gabre, R.M., Kruminis-Łozowska, W., Racewicz, M., Kubica-Biernat, B., 2004. *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. Ann. Agric. Environ. Med. 11, 109-114.

Stańczak, J., 2006. The occurrence of Spotted Fever Group (SFG) Rickettsiae in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) in northern Poland. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1078, 512-514.

Stańczak, J., Racewicz, M., Michalik, J., Buczek, A., 2008. Distribution of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* tick populations in Poland. Int. J. Med. Microbiol. 298, 231-234.

Stanek, G., 2009. Büchse der Pandora: Krankheitserreger in *Ixodes ricinus*-Zecken in Mitteleuropa. Wien. Klin. Wochenschr. 121, 673-683.

Stefanidesova, K., Kocianova, E., Boldis, V., Kostanova, Z., Kanka, P., Nemethova, D., Spitalska, E., 2008. Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* infection in free-ranging ungulates in central Slovakia. Eur. J. Wildl. Res. 54, 519-524.

Stuen, S., Bergström, K., Petrovec, M., Van de Pol, I., Schouls, L.M., 2003. Differences in clinical manifestations and hematological and serological responses after experimental infection with genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in sheep. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10, 692-695.

Stuen, S., 2007. *Anaplasma phagocytophilum* - the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. Vet. Res. Commun. 31 Suppl 1, 79-84.

Süss, J., Fingerle, V., Hunfeld, K.P., Schrader, C., Wilske, B., 2004. Durch Zecken übertragene humanpathogene und bisher als apathogen geltende Mikroorganismen in Europa. Teil II: Bakterien, Parasiten und Mischinfektionen. Bundesgesundheitsbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 47, 470-486.

Süss, J., Schrader, C., 2004. Durch Zecken übertragene humanpathogene und bisher als apathogen geltende Mikroorganismen in Europa. Teil I: Zecken und Viren. Bundesgesundheitsbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 47, 392-404.

Süss, J., Klaus, C., Gerstengarbe, F.W., Werner, P.C., 2008. What makes ticks tick? Climate change, ticks, and tick-borne diseases. *J. Travel Med.* 15, 39-45.

Tampieri, M.P., Galuppi, R., Bonoli, C., Cancrini, G., Moretti, A., Pietrobelli, M., 2008. Wild ungulates as *Babesia* hosts in northern and central Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 667-674.

Tamura, A., Ohashi, N., Urakami, H., Miyamura, S., 1995. Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus, *Orientia* gen. nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 589-591.

Telford, S.R., 3rd, Wormser, G.P., 2010. *Bartonella* spp. transmission by ticks not established. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 379-384.

Tijssse-Klasen, E., Fonville, M., Gassner, F., Nijhof, A.M., Hovius, E.K., Jongejan, F., Takken, W., Reimerink, J.R., Overgaauw, P.A., Sprong, H., 2011. Absence of zoonotic *Bartonella* species in questing ticks: First detection of *Bartonella clarridgeiae* and *Rickettsia felis* in cat fleas in the Netherlands. *Parasit. Vectors* 4, 61.

Tijssse, E., Fonville, M., Reimerink, J.H., Spitzen-van der Sluijs, A., Sprong, H., 2010. Role of sand lizards in the ecology of Lyme and other tick-borne diseases in the Netherlands. *Parasit. Vectors* 3, 42.

Tomasiewicz, K., Modrzewska, R., Buczek, A., Stańczak, J., Maciukajć, J., 2004. The risk of exposure to *Anaplasma phagocytophilum* infection in Mid-Eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 11, 261-264.

Trotta, M., Carli, E., Novari, G., Furlanello, T., Solano-Gallego, L., 2009. Clinicopathological findings, molecular detection and characterization of *Babesia gibsoni* infection in a sick dog from Italy. *Vet. Parasitol.* 165, 318-322.

Uilenberg, G., Thiaucourt, F., Jongejan, F., 2004. On molecular taxonomy: what is in a name? *Exp. Appl. Acarol.* 32, 301-312.

Uilenberg, G., 2006. *Babesia*--a historical overview. *Vet. Parasitol.* 138, 3-10.

Uspensky, I., 2008. Ticks (Acari: Ixodoidea) as urban pests and vectors with special emphasis on ticks outside their geographical range. In: *Proceedings of the Sixth International Conference on Urban Pests, Hungary.*

Václav, R., Ficová, M., Prokop, P., Betáková, T., 2010. Associations Between Coinfection Prevalence of *Borrelia lusitaniae*, *Anaplasma* sp., and *Rickettsia* sp. in Hard Ticks Feeding on Reptile Hosts. *Microb. Ecol.* 61, 245-253

Vannier, E., Krause, P.J., 2009. Update on babesiosis. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2009, 984568.

Vayssier-Taussat, M., Le Rhun, D., Bonnet, S., Cotté, V., 2009. Insights in *Bartonella* host specificity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1166, 127-132.

von Loewenich, F.D., Baumgarten, B.U., Schröppel, K., Geissdörfer, W., Röllinghoff, M., Bogdan, C., 2003a. High diversity of ankA sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5033-5040.

Von Loewenich, F.D., Stumpf, G., Baumgarten, B.U., Röllinghoff, M., Dumler, J.S., Bogdan, C., 2003b. A case of equine granulocytic ehrlichiosis provides molecular evidence for the presence of pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* (HGE agent) in Germany. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22, 303-305.

von Stedingk, L.V., Gurtelschmid, M., Hanson, H.S., Gustafson, R., Dotevall, L., Engvall, E.O., Granstrom, M., 1997. The human granulocytic ehrlichiosis

(HGE) agent in Swedish ticks. Clin. Microbiol. Infect. 3, 573-574.

Walder, G., Fuchs, D., Sarcletti, M., Berek, K., Falkensammer, B., Huber, K., Petrovec, M., Dierich, M.P., Würzner, R., 2006. Human granulocytic anaplasmosis in Austria: epidemiological, clinical, and laboratory findings in five consecutive patients from Tyrol, Austria. Int. J. Med. Microbiol. 296 Suppl 40, 297-301.

Walker, D.H., Dumler, J.S., 1996. Emergence of the ehrlichioses as human health problems. Emerg. Infect. Dis. 2, 18-29.

Wicki, R., Sauter, P., Mettler, C., Natsch, A.,ENZler, T., Pusterla, N., Kuhnert, P., Egli, G., Bernasconi, M., Lienhard, R., Lutz, H., Leutenegger, C.M., 2000. Swiss Army Survey in Switzerland to determine the prevalence of *Francisella tularensis*, members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and tick-borne encephalitis virus in ticks. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 19, 427-432.

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

Wielinga, P.R., Fonville, M., Sprong, H., Gaasenbeek, C., Borgsteede, F., Giessen, J.W., 2008. Persistent Detection of *Babesia* EU1 and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* in The Netherlands During a 5-Year Surveillance: 2003-2007. Vector Borne Zoonotic Dis. 9, 119-122.

Wójcik-Fatla, A., Szymańska, J., Wdowiak, L., Buczek, A., Dutkiewicz, J., 2009. Coincidence of three pathogens (*Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti*) in *Ixodes ricinus* ticks in the Lublin macroregion. Ann. Agric. Environ. Med. 16, 151-158.

Woldehiwet, Z., 2006. *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants in Europe. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1078, 446-460.

Woldehiwet, Z., 2010. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. Vet. Parasitol. 167, 108-122.

Wölfel, R., Terzioglu, R., Kiessling, J., Wilhelm, S., Essbauer, S., Pfeffer, M., Dobler, G., 2006. *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Bavaria, Germany. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1078, 509-511.

Zeman, P., Pecha, M., 2008. Segregation of genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* circulating among wild ruminants within a Bohemian forest (Czech Republic). Int. J. Med. Microbiol. 298, 203-210.

Zintl, A., Mulcahy, G., Skerrett, H.E., Taylor, S.M., Gray, J.S., 2003. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. Clin. Microbiol. Rev. 16, 622-636.

10 Abbildungen

Abbildung 1: Taxonomie der Ordnung Ixodida (modifiziert nach Eckert et al. 2008)

Abbildung 2: Lebenszyklus von *Ixodes ricinus*

Abbildung 3: Langwieder Seenplatte

Abbildung 4: Englischer Garten

Abbildung 5: Nymphenburger Schlosspark

Abbildung 6: Dörnbergpark

Abbildung 7: Donaupark

Abbildung 8: Glacis

Abbildung 9: Luitpoldpark

Abbildung 10: Wittelsbacher Park

Abbildung 11: Schlosspark

Abbildung 12: Anzahl gefundener *Ixodes ricinus* je Entwicklungsstadium im Vergleich 2009/2010

Abbildung 13: Zeckendichte (Adulte und Nymphen/100m²) je Standort im monatlichen Vergleich 2009/2010

11 Tabellen

- Tabelle 1:** Krankheitserreger, die durch *Ixodes ricinus* übertragen werden (Auswahl) (modifiziert nach Eckert et al. 2008)
- Tabelle 2:** Vorkommen von *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* in Europa (nur Zecken von Vegetation)
- Tabelle 3:** Vorkommen von *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* in Europa (nur Zecken von Vegetation)
- Tabelle 4:** Vorkommen von *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* in Europa (nur Zecken von Vegetation)
- Tabelle 5:** Vorkommen von *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Europa (nur Zecken von Vegetation)
- Tabelle 6:** Verwendete Primer zur Ermittlung von Pathogen-DNA in *Ixodes ricinus*
- Tabelle 7:** Pipettierschema der konventionellen PCR mit dem Ziel-Gen *18S rRNA* von *Babesia* spp.
- Tabelle 8:** Physikalische Bedingungen der konventionellen PCR mit dem Ziel-Gen *18S rRNA* von *Babesia* spp.
- Tabelle 9:** Pipettierschema der real-time PCR mit dem Ziel-Gen *msp2* von *Anaplasma phagocytophilum*.
- Tabelle 10:** Pipettierschema der nested PCR mit dem Ziel-Gen *16S rRNA* von *Anaplasma phagocytophilum*.
- Tabelle 11:** Physikalische Bedingungen der real-time PCR mit dem Ziel-Gen *msp2* von *Anaplasma phagocytophilum*.
- Tabelle 12:** Physikalische Bedingungen der nested PCR mit dem Ziel-Gen *16S rRNA* von *Anaplasma phagocytophilum*.
- Tabelle 13:** Pipettierschema der konventionellen PCR mit dem Ziel-Gen *gltA* von *Rickettsia* spp.

- Tabelle 14:** Pipettierschema der konventionellen PCR mit dem Ziel-Gen *ompB* von *Rickettsia* spp.
- Tabelle 15:** Physikalische Bedingungen der konventionellen PCR mit dem Ziel-Gen *gltA* von *Rickettsia* spp.
- Tabelle 16:** Physikalische Bedingungen der konventionellen PCR mit dem Ziel-Gen *ompB* von *Rickettsia* spp.
- Tabelle 17:** Anzahl gefundener *I. ricinus* je Standort, Entwicklungsstadium und Monat, im Vergleich 2009/2010
- Tabelle 18:** Verwendete Geräte
- Tabelle 19:** Verwendete Kits, Oligonukleotide, Enzyme, Chemikalien und Gase
- Tabelle 20:** Anzahl der infizierten *Ixodes ricinus* je Standort, Monat und Entwicklungsstadium
- Tabelle 21:** Prozentualer Anteil infizierter *Ixodes ricinus* je Standort, Monat und Entwicklungsstadium
- Tabelle 22:** Gesamtmodell der logistischen Regression mit allen Interaktionen bezüglich Untersuchungsjahr, Entwicklungsstadium, Monat und Standort
- Tabelle 23:** Jährlicher Vergleich (2009 zu 2010) der Standorte bezüglich *Anaplasma phagocytophilum*
- Tabelle 24:** Modell simultaner paarweiser Tests mit Tukey Kontrasten (Entwicklungsstadium der Zecke)
- Tabelle 25:** Modell simultaner paarweiser Tests mit Tukey Kontrasten (Monat der Sammlung)
- Tabelle 26:** Modell simultaner paarweiser Tests mit Tukey Kontrasten (Standort)

12 Anhang

12.1 Material

12.1.1 Geräte

Tabelle 18: Verwendete Geräte

Gerät	Firma
AB-7500 Real-Time PCR system	(Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
Baltec CPD 030	(Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland)
Baltec SCD 040	(Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland)
Heißluftsterilisator	(Memmert, Schwabach, Deutschland)
Mastercycler® gradient	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
NanoDrop® ND-1000	(PiqLab, Erlangen, Deutschland)
TissueLyser	(Qiagen, Hilden, Deutschland)

12.1.2 Kits, Oligonukleotide, Enzyme, Chemikalien und Gase

Tabelle 19: Verwendete Kits, Oligonukleotide, Enzyme, Chemikalien und Gase

Kits	Firma
Expand High Fidelity Plus PCR System	(Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland)
HotStarTaq DNA Polymerase Kit	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
HotStarTaqPlus DNA Polymerase Kit	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
QIAamp DNA Mini Kit	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
QIAquick PCR Purification Kit	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
SYBR®-Green PCR Master Mix (2x)	(Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
Oligonukleotide	
dNTP mix, PCR grade	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
PCR grade nucleotide mix	(Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland)
BJ1, BN2	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland)

<i>Babesia capreoli</i>	TTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCAT	240
<i>Babesia divergens</i>	TTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCAT	240
<i>Babesia odocoilei</i>	TTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCAT	239
<i>Babesia</i> sp.EU1 (Zecke)	TTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCAT	240
<i>Babesia</i> sp.EU1 (Reh)	TTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCAT	240

<i>Babesia capreoli</i>	GGATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCATTTTGTGGTTTGTGAACCTTAGTAATGGTTA	300
<i>Babesia divergens</i>	GGATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCATTTTGTGGTTTGTGAACCTTAGTAATGGTTA	300
<i>Babesia odocoilei</i>	GGATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCATTTTGTGGTTTGTGAACCTTAGTAATGGTTA	299
<i>Babesia</i> sp.EU1 (Zecke)	GGATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCATTTTGTGGTTTGTGAACCTTAGTAATGGTTA	300
<i>Babesia</i> sp.EU1 (Reh)	GGATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCATTTTGTGGTTTGTGAACCTTAGTAATGGTTA	300

<i>Babesia capreoli</i>	ATAGGAACGGTTGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTGTA	360
<i>Babesia divergens</i>	ATAGGAACGGTTGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTGTA	360
<i>Babesia odocoilei</i>	ATAGGAACGGTTGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTGTA	359
<i>Babesia</i> sp.EU1 (Zecke)	ATAGGAACGGTTGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTGTA	360
<i>Babesia</i> sp.EU1 (Reh)	ATAGGAACGGTTGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTGTA	360

<i>Babesia capreoli</i>	AAGACGAAC TACTGCCAAAGCATTGCCAAGGACGTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTT	420
<i>Babesia divergens</i>	AAGACGAAC TACTGCCAAAGCATTGCCAAGGACGTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTT	420
<i>Babesia odocoilei</i>	AAGACGAAC TACTGCCAAAGCATTGCCAAGGACGTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTT	419
<i>Babesia</i> sp.EU1 (Zecke)	AAGACGAAC TACTGCCAAAGCATTGCCAAGGACGTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTT	420
<i>Babesia</i> sp.EU1 (Reh)	AAGACGAAC TACTGCCAAAGCATTGCCAAGGACGTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTT	420

<i>Babesia capreoli</i>	AGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGT	447
<i>Babesia divergens</i>	AGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGT	447
<i>Babesia odocoilei</i>	AGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGT	447
<i>Babesia</i> sp.EU1 (Zecke)	AGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGT	447
<i>Babesia</i> sp.EU1 (Reh)	AGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGT	447

12.2.2 Sequenzvergleich des 18S rRNA Gens von *Babesia divergens*

Diese Studie:

Babesia divergens (Zecke): JN036427

Babesia divergens (Rotwild): GQ304525

Babesia divergens (Rind): FJ944826

Babesia capreoli: HQ638137

<i>Babesia divergens</i> (Zecke)	GCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAC TTGTTGCAGTTAAAAA	50
<i>Babesia divergens</i> (Rotwild)	GCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAC TTGTTGCAGTTAAAAA	50
<i>Babesia divergens</i> (Rind)	GCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAC TTGTTGCAGTTAAAAA	50
<i>Babesia capreoli</i>	GCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAC TTGTTGCAGTTAAAAA	50

<i>Babesia divergens</i> (Zecke)	GCTCGTAGTTGAATTTTGGCGTGGTGAATATTGACTAATGTCGAGATT	100
<i>Babesia divergens</i> (Rotwild)	GCTCGTAGTTGAATTTTGGCGTGGTGAATATTGACTAATGTCGAGATT	100
<i>Babesia divergens</i> (Rind)	GCTCGTAGTTGAATTTTGGCGTGGTGAATATTGACTAATGTCGAGATT	100
<i>Babesia capreoli</i>	GCTCGTAGTTGAATTTTGGCGTGGTGAATATTGACTAATGTCGAGATT	100

<i>Babesia divergens</i> (Zecke)	GCACTTCGCTTTTGGGATTTATCCCTTTT TACTTTGAGAAAATTAGAGTG	150
<i>Babesia divergens</i> (Rotwild)	GCACTTCGCTTTTGGGATTTATCCCTTTT TACTTTGAGAAAATTAGAGTG	150
<i>Babesia divergens</i> (Rind)	GCACTTCGCTTTTGGGATTTATCCCTTTT TACTTTGAGAAAATTAGAGTG	150
<i>Babesia capreoli</i>	GCACTTCGCTTTTGGGATTTATCCCTTTT TACTTTGAGAAAATTAGAGTG	150

<i>Babesia divergens</i> (Zecke)	TTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAG	200
<i>Babesia divergens</i> (Rotwild)	TTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAG	200
<i>Babesia divergens</i> (Rind)	TTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAG	200
<i>Babesia capreoli</i>	TTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAG	200

<i>Babesia divergens</i> (Zecke)	GACTTTGGTTCTATTTTGTGGTTTGTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGG	250
<i>Babesia divergens</i> (Rotwild)	GACTTTGGTTCTATTTTGTGGTTTGTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGG	250
<i>Babesia divergens</i> (Rind)	GACTTTGGTTCTATTTTGTGGTTTGTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGG	250
<i>Babesia capreoli</i>	GACTTTGGTTCTATTTTGTGGTTTGTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGG	250

<i>Babesia divergens</i> (Zecke)	AACGGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATT	300
<i>Babesia divergens</i> (Rotwild)	AACGGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATT	300
<i>Babesia divergens</i> (Rind)	AACGGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATT	300
<i>Babesia capreoli</i>	AACGGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATT	300

<i>Babesia divergens</i> (Zecke)	TGT	303
<i>Babesia divergens</i> (Rotwild)	TGT	303
<i>Babesia divergens</i> (Rind)	TGT	303
<i>Babesia capreoli</i>	TGT	303

12.2.3 Sequenzvergleich des 18S rRNA Gens von *Babesia divergens/capreoli*

Diese Studie:

Babesia divergens/capreoli (Zecke)

Babesia capreoli: HQ638137

Babesia divergens: AY098643

<i>Babesia divergens/capreoli</i> (Zecke)	TGACCTAAACCCCTCACCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAG	50
<i>Babesia divergens</i>	TGACCTAAACCCCTCACCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAG	50
<i>Babesia capreoli</i>	TGACCTAAACCCCTCACCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAG	50

<i>Babesia divergens/capreoli</i> (Zecke)	CAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTT	100
<i>Babesia divergens</i>	CAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTT	100
<i>Babesia capreoli</i>	CAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTT	100

<i>Babesia divergens/capreoli</i> (Zecke)	AAAAAGCTCGTAGTTGAATTTTGCCTGGTGTAAATATGACTGATGTCG	150
<i>Babesia divergens</i>	AAAAAGCTCGTAGTTGAATTTTGCCTGGTGTAAATATGACTGATGTCG	150
<i>Babesia capreoli</i>	AAAAAGCTCGTAGTTGAATTTTGCCTGGTGTAAATATGACTGATGTCG	150

<i>Babesia divergens/capreoli</i> (Zecke)	AGATTGCACTTCGCTTTTGGGATTTTCCCTTTTACTTTGAGAAAATTA	200
<i>Babesia divergens</i>	AGATTGCACTTCGCTTTTGGGATTTTCCCTTTTACTTTGAGAAAATTA	200
<i>Babesia capreoli</i>	AGATTGCACTTCGCTTTTGGGATTTTCCCTTTTACTTTGAGAAAATTA	200

<i>Babesia divergens/capreoli</i> (Zecke)	GAGTGTTC AAGCAGACTTTTGTCTGAATACTTCAGCATGGAATAATAG	250
<i>Babesia divergens</i>	GAGTGTTC AAGCAGACTTTTGTCTGAATACTTCAGCATGGAATAATAG	250
<i>Babesia capreoli</i>	GAGTGTTC AAGCAGACTTTTGTCTGAATACTTCAGCATGGAATAATAG	250

<i>Babesia divergens/capreoli</i> (Zecke)	AGTAGGACTTTGGTTCATTTTGTGGTTTGTGAACCTTAGTAATGGTTA	300
<i>Babesia divergens</i>	AGTAGGACTTTGGTTCATTTTGTGGTTTGTGAACCTTAGTAATGGTTA	300
<i>Babesia capreoli</i>	AGTAGGACTTTGGTTCATTTTGTGGTTTGTGAACCTTAGTAATGGTTA	300

<i>Babesia divergens/capreoli</i> (Zecke)	ATAGGAACGGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCT	350
<i>Babesia divergens</i>	ATAGGAACGGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCT	350
<i>Babesia capreoli</i>	ATAGGAACGGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCT	350

<i>Babesia divergens/capreoli</i> (Zecke)	AGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCCAAGGACGTTTTC	400
<i>Babesia divergens</i>	AGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCCAAGGACGTTTTC	400
<i>Babesia capreoli</i>	AGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCCAAGGACGTTTTC	400

<i>Babesia divergens/capreoli</i> (Zecke)	ATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGT	447
<i>Babesia divergens</i>	ATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGT	447
<i>Babesia capreoli</i>	ATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGT	447

12.2.4 Sequenzvergleich des 18S rRNA Gens von Babesia gibsoni-like

Diese Studie:

Babesia gibsoni-like (Zecke): JN036428

Babesia gibsoni (Hund/Asien): FJ769388

Babesia gibsoni (Hund/USA): AF396749

<i>Babesia gibsoni</i> -like (Zecke)	TGACGTAAAATCTCACCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAG	50
<i>Babesia gibsoni</i> (Hund/USA)	TGACGTAAAATCTCACCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAG	50
<i>Babesia gibsoni</i> (Hund/Asien)	TGACGTAAAATCTCACCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAG	50

<i>Babesia gibsoni</i> -like (Zecke)	CAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTGTTGCAGTT	100
<i>Babesia gibsoni</i> (Hund/USA)	CAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTGTTGCAGTT	100
<i>Babesia gibsoni</i> (Hund/Asien)	CAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTGTTGCAGTT	100

<i>Babesia gibsoni</i> -like (Zecke)	AAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCGTTGCCCGACTCGGCTACTTGCCTT	150
<i>Babesia gibsoni</i> (Hund/USA)	AAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCGTTGCCCGACTCGGCTACTTGCCTT	150
<i>Babesia gibsoni</i> (Hund/Asien)	AAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCGTTGCCCGACTCGGCTACTTGCCTT	150

<i>Babesia gibsoni</i> -like (Zecke)	GTCTGGTTTCGCTTTTGGGGTTTCCCTTTTACTTTGAGAAAATTAGA	200
<i>Babesia gibsoni</i> (Hund/USA)	GTCTGGTTTCGCTTTTGGGGTTTCCCTTTTACTTTGAGAAAATTAGA	200
<i>Babesia gibsoni</i> (Hund/Asien)	GTCTGGTTTCGCTTTTGGGGTTTCCCTTTTACTTTGAGAAAATTAGA	200

<i>Babesia gibsoni</i> -like (Zecke)	GTGTTTCAAGCAGACTTGTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAAAG	250
<i>Babesia gibsoni</i> (Hund/USA)	GTGTTTCAAGCAGACTTGTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAAAG	250
<i>Babesia gibsoni</i> (Hund/Asien)	GTGTTTCAAGCAGACTTGTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAAAG	250

<i>Babesia gibsoni</i> -like (Zecke)	TAGGACTTTGGTTCTATTTTGGTTGGTTTGTGAACCTTAGTAATGGTTAAT	300
<i>Babesia gibsoni</i> (Hund/USA)	TAGGACTTTGGTTCTATTTTGGTTGGTTTGTGAACCTTAGTAATGGTTAAT	300
<i>Babesia gibsoni</i> (Hund/Asien)	TAGGACTTTGGTTCTATTTTGGTTGGTTTGTGAACCTTAGTAATGGTTAAT	300

<i>Babesia gibsoni</i> -like (Zecke)	AGGAACGGTTGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAG	350
<i>Babesia gibsoni</i> (Hund/USA)	AGGAACGGTTGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAG	350
<i>Babesia gibsoni</i> (Hund/Asien)	AGGAACGGTTGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAG	350

<i>Babesia gibsoni</i> -like (Zecke)	ATTTGTTAAAGACGAACACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGACGTTTTCAT	400
<i>Babesia gibsoni</i> (Hund/USA)	ATTTGTTAAAGACGAACACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGACGTTTTCAT	400
<i>Babesia gibsoni</i> (Hund/Asien)	ATTTGTTAAAGACGAACACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGACGTTTTCAT	400

<i>Babesia gibsoni</i> -like (Zecke)	TAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGT	445
<i>Babesia gibsoni</i> (Hund/USA)	TAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGT	445
<i>Babesia gibsoni</i> (Hund/Asien)	TAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGT	445

12.2.5 Sequenzvergleich des 16S rRNA Gens von Anaplasma phagocytophilum

Diese Studie:

Variante A: JF895438-45;

Variante B: JF895447;

Variante G: JF895449

Variante X: JF895448;

Variante Y: JF895450-51;

Variante Z: JF895446

Prototyp (HGA-Agent): U02521;

Ehrlichia sp. „Frankonia 2“: AF136712

Variante_B	ATRAAGAATAAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCT	50
Prototyp (HGA-Agent)	ATRAAGAATAAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCT	50
Variante_A	ATRAAGAATAAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCT	50
<i>Ehrlichia</i> sp. „Frankonia 2“	ATRAAGAATAAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCT	50
Variante_G	ATRAAGAATAAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCT	50
Variante_Z	ATRAAGAATAAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCT	50
Variante_X	ATCAAGAATAAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCT	50
Variante_Y	ATCAAGAATAAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCT	50
	** .***** .*****	
Variante_B	AGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCT	100
Prototyp (HGA-Agent)	AGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCT	100
Variante_A	AGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCT	100
<i>Ehrlichia</i> sp. „Frankonia 2“	AGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCT	100
Variante_G	AGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCT	100
Variante_Z	AGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCT	100
Variante_X	AGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCT	100
Variante_Y	AGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCT	100

Variante_B	CGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAG	150
Prototyp (HGA-Agent)	CGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAG	150
Variante_A	CGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAG	150
<i>Ehrlichia</i> sp. „Frankonia 2“	CGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAG	150
Variante_G	CGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAG	150
Variante_Z	CGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAG	150
Variante_X	CGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAG	150
Variante_Y	CGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAG	150

Variante_B	TTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAG	200
Prototyp (HGA-Agent)	TTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAG	200
Variante_A	TTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAG	200
<i>Ehrlichia</i> sp. „Frankonia 2“	TTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAG	200
Variante_G	TTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAG	200
Variante_Z	TTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAG	200
Variante_X	TTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAG	200
Variante_Y	TTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAG	200

Variante_B	GATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG	250
Prototyp (HGA-Agent)	GATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG	250
Variante_A	GATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG	250
<i>Ehrlichia</i> sp. „Frankonia 2“	GATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG	250
Variante_G	GATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG	250
Variante_Z	GATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG	250
Variante_X	GATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG	250
Variante_Y	GATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG	250

Variante_B	CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCC	300
Prototyp (HGA-Agent)	CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCC	300
Variante_A	CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCC	300
<i>Ehrlichia</i> sp. „Frankonia 2“	CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCC	300
Variante_G	CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCC	300
Variante_Z	CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCC	300
Variante_X	CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCC	300
Variante_Y	CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCC	300

Variante_B	GCCTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGA	350
Prototyp (HGA-Agent)	GCCTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGA	350
Variante_A	GCCTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGA	350
<i>Ehrlichia</i> sp. „Frankonia 2“	GCCTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGA	350
Variante_G	GCCTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGA	350
Variante_Z	GCCTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGA	350
Variante_X	GCCTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGA	350
Variante_Y	GCCTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGA	350
	** .*****	
Variante_B	TAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCC	400
Prototyp (HGA-Agent)	TAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCC	400
Variante_A	TAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCC	400
<i>Ehrlichia</i> sp. „Frankonia 2“	TAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCC	400
Variante_G	TAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCC	400
Variante_Z	TAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCC	400
Variante_X	TAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCC	400
Variante_Y	TAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCC	400

Variante_B	CGCGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG	450
Prototyp (HGA-Agent)	CGCGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG	450
Variante_A	CGCGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG	450
<i>Ehrlichia</i> sp. „Frankonia 2“	CGCGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG	450
Variante_G	CGCGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG	450
Variante_Z	CGCGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG	450
Variante_X	CGCGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG	450
Variante_Y	CGCGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG	450

```

Variante_B GCATGTAGGCGGTTCCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC 497
Prototyp (HGA-Agent) GCATGTAGGCGGTTCCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC 497
Variante_A GCATGTAGGCGGTTCCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC 497
Ehrlichia sp. „Frankonia 2“ GCATGTAGGCGGTTCCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC 497
Variante_G GCATGTAGGCGGTTCCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC 497
Variante_Z GCATGTAGGCGGTTCCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC 497
Variante_X GCATGTAGGCGGTTCCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC 497
Variante_Y GCATGTAGGCGGTTCCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAAC 497
*****
    
```

12.2.6 Sequenzvergleich des *gltA* Gens von *Rickettsia helvetica*

Diese Studie:

Rickettsia helvetica: JN036401-10

Rickettsia helvetica (Russland): HM371185

Rickettsia helvetica (Serbien): GQ925825

```

Rickettsia helvetica (Russland) GAAATGGTAGTTCFGAGAATATCCCTAAATATATAGCTAAAGCTAAGGA 50
Rickettsia helvetica (Serbien) GAAATGGTAGTTCFGAGAATATCCCTAAATATATAGCTAAAGCTAAGGA 50
Rickettsia helvetica GAAATGGTAGTTCFGAGAATATCCCTAAATATATAGCTAAAGCTAAGGA 50
*****

Rickettsia helvetica (Russland) TAAAAATGATCCGTTTAGGTTAATAGGCTTCGGTCATCGTGTATATAAAA 100
Rickettsia helvetica (Serbien) TAAAAATGATCCGTTTAGGTTAATAGGCTTCGGTCATCGTGTATATAAAA 100
Rickettsia helvetica TAAAAATGATCCGTTTAGGTTAATAGGCTTCGGTCATCGTGTATATAAAA 100
*****

Rickettsia helvetica (Russland) ACTACGATCCACGTGCCGCAGTACTTAAAGAACTTGTAAAGGAAGTATTA 150
Rickettsia helvetica (Serbien) ACTACGATCCACGTGCCGCAGTACTTAAAGAACTTGTAAAGGAAGTATTA 150
Rickettsia helvetica ACTACGATCCACGTGCCGCAGTACTTAAAGAACTTGTAAAGGAAGTATTA 150
*****

Rickettsia helvetica (Russland) AAGGAACTCGGACAGCTAGAAAACAATCCGCTCTTACAATAGCAATAGA 200
Rickettsia helvetica (Serbien) AAGGAACTCGGACAGCTAGAAAACAATCCGCTCTTACAATAGCAATAGA 200
Rickettsia helvetica AAGGAACTCGGACAGCTAGAAAACAATCCGCTCTTACAATAGCAATAGA 200
*****

Rickettsia helvetica (Russland) ACTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTTATTGAGAGAAAATTAT 250
Rickettsia helvetica (Serbien) ACTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTTATTGAGAGAAAATTAT 250
Rickettsia helvetica ACTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTTATTGAGAGAAAATTAT 250
*****

Rickettsia helvetica (Russland) ATCCAAATGTTGATTTTTATTTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATA 300
Rickettsia helvetica (Serbien) ATCCAAATGTTGATTTTTATTTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATA 300
Rickettsia helvetica ATCCAAATGTTGATTTTTATTTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATA 300
*****

Rickettsia helvetica (Russland) CCGTCGCAAA 310
Rickettsia helvetica (Serbien) CCGTCGCAAA 310
Rickettsia helvetica CCGTCGCAAA 310
*****
    
```

12.2.7 Sequenzvergleich des *ompB* Gens von *Rickettsia monacensis*

IrR/Munich

Diese Studie:

Rickettsia monacensis (Variante1): JN036418-19

Rickettsia monacensis (Variante2):: JN036413-17

Rickettsia monacensis (IrR/Munich) 1: EU330639

Rickettsia monacensis (IrR/Munich) 2: EU330640

<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante1)	TTAGGTATAGAGAATGGTACTCTAAAGTTAAAGCAAGTACGTTTACTAC	50
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)1	TTAGGTATAGAGAATGGTACTCTAAAGTTAAAGCAAGTACGTTTACTAC	50
<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante2)	TTAGGTATAGAGAATGGTACTCTAAAGTTAAAGCAAGTACGTTTACTAC	50
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)2	TTAGGTATAGAGAATGGTACTCTAAAGTTAAAGCAAGTACGTTTACTAC	50

<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante1)	AACTATAACAACCTTAGGTAGTATTATTCGCAACTAACGCAATAATTAATG	100
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)1	AACTATAACAACCTTAGGTAGTATTATTCGCAACTAACGCAATAATTAATG	100
<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante2)	AACTATAACAACCTTAGGTAGTATTATTCGCAACTAACGCAATAATTAATG	100
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)2	AACTATAACAACCTTAGGTAGTATTATTCGCAACTAACGCAATAATTAATG	100

<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante1)	ACGGTGTAACTGTTACTACAGGCGGTATAGCCGGAACAGATTCGACGGT	150
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)1	ACGGTGTAACTGTTACTACAGGCGGTATAGCCGGAACAGATTCGACGGT	150
<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante2)	ACGGTGTAACTGTTACTACAGGCGGTATAGCCGGAACAGATTCGACGGT	150
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)2	ACGGTGTAACTGTTACTACAGGCGGTATAGCCGGAACAGATTCGACGGT	150

<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante1)	AAAATTACTCTTGGAAAGTGTAAACGGTAACGCTAATGTAAGATTGCTGA	200
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)1	AAAATTACTCTTGGAAAGTGTAAACGGTAACGCTAATGTAAGATTGCTGA	200
<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante2)	AAAATTACTCTTGGAAAGTGTAAACGGTAACGCTAATGTAAGATTGCTGA	200
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)2	AAAATTACTCTTGGAAAGTGTAAACGGTAACGCTAATGTAAGATTGCTGA	200

<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante1)	CGGTACATTTTCTGATTCTACAAGTATGATTGTTACTACTAAAGCTAATA	250
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)1	CGGTACATTTTCTGATTCTACAAGTATGATTGTTACTACTAAAGCTAATA	250
<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante2)	CGGTACATTTTCTGATTCTACAAGTATGATTGTTACTACTAAAGCTAATA	250
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)2	CGGTACATTTTCTGATTCTACAAGTATGATTGTTACTACTAAAGCTAATA	250

<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante1)	GCGGTACCGTAACCTTATTTAGGTGATGCGTATGTTGGTAATATAGGTGCT	300
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)1	GCGGTACCGTAACCTTATTTAGGTGATGCGTATGTTGGTAATATAGGTGCT	300
<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante2)	GCGGTACCGTAACCTTATTTAGGTGATGCGTATGTTGGTAATATAGGTGCT	300
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)2	GCGGTACCGTAACCTTATTTAGGTGATGCGTATGTTGGTAATATAGGTGCT	300

<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante1)	TCAGATACTCCTGTAGCTTCTGTTAAGTTT	350
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)1	TCAGATACTCCTGTAGCTTCTGTTAAGTTT	350
<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante2)	TCAGATACTCCTGTAGCTTCTGTTAAGTTT	350
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)2	TCAGATACTCCTGTAGCTTCTGTTAAGTTT	350

<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante1)	AGGATTACAAGGAAATATTTATTCAAGTCACAGACTTTGGTACTTATA	400
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)1	AGGATTACAAGGAAATATTTATTCAAGTCACAGACTTTGGTACTTATA	400
<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante2)	AGGATTACAAGGAAATATTTATTCAAGTCACAGACTTTGGTACTTATA	400
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)2	AGGATTACAAGGAAATATTTATTCAAGTCACAGACTTTGGTACTTATA	400

<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante1)	ACTTAGGTGTTTTAAATCTAATGTAATTTTAGGCGGCGGTACTACTGCT	450
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)1	ACTTAGGTGTTTTAAATCTAATGTAATTTTAGGCGGCGGTACTACTGCT	450
<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante2)	ACTTAGGTGTTTTAAATCTAATGTAATTTTAGGCGGCGGTACTACTGCT	450
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)2	ACTTAGGTGTTTTAAATCTAATGTAATTTTAGGCGGCGGTACTACTGCT	450

<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante1)	ATTAACGGTGAAATCGATCTTGATACAAATATCTTAACATTTGCAAGCGG	500
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)1	ATTAACGGTGAAATCGATCTTGATACAAATATCTTAACATTTGCAAGCGG	500
<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante2)	ATTAACGGTGAAATCGATCTTGATACAAATATCTTAACATTTGCAAGCGG	500
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)2	ATTAACGGTGAAATCGATCTTGATACAAATATCTTAACATTTGCAAGCGG	500

<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante1)	TACTTCAACATGGGGAAGTAATACTTCTATTGAAACTACTTTAACAGTAG	550
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)1	TACTTCAACATGGGGAAGTAATACTTCTATTGAAACTACTTTAACAGTAG	550
<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante2)	TACTTCAACATGGGGAAGTAATACTTCTATTGAAACTACTTTAACAGTAG	550
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)2	TACTTCAACATGGGGAAGTAATACTTCTATTGAAACTACTTTAACAGTAG	550

<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante1)	CAAACGGTAATATAGGTCACATCGTTATCGCGGAAGGTGCTCAAGTTAAT	600
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)1	CAAACGGTAATATAGGTCACATCGTTATCGCGGAAGGTGCTCAAGTTAAT	600
<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante2)	CAAACGGTAATATAGGTCACATCGTTATCGCGGAAGGTGCTCAAGTTAAT	600
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)2	CAAACGGTAATATAGGTCACATCGTTATCGCGGAAGGTGCTCAAGTTAAT	600

<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante1)	GCAACAACCTACAGGAACAACAACCATTAACGTACAAGATAATACCAATGC	650
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)1	GCAACAACCTACAGGAACAACAACCATTAACGTACAAGATAATACCAATGC	650
<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante2)	GCAACAACCTACAGGAACAACAACCATTAACGTACAAGATAATACCAATGC	650
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)2	GCAACAACCTACAGGAACAACAACCATTAACGTACAAGATAATACCAATGC	650

<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante1)	AAATTTTCAGTGGTACACAAACTTATACTTTAATTCAGGTTGGTGTAGAT	700
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)1	AAATTTTCAGTGGTACACAAACTTATACTTTAATTCAGGTTGGTGTAGAT	700
<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante2)	AAATTTTCAGTGGTACACAAACTTATACTTTAATTCAGGTTGGTGTAGAT	700
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)2	AAATTTTCAGTGGTACACAAACTTATACTTTAATTCAGGTTGGTGTAGAT	700

<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante1)	TTAACGGTACTTTTAGGAGGTCTTA	724
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)1	TTAACGGTACTTTTAGGAGGTCTTA	724
<i>Rickettsia monacensis</i> (Variante2)	TTAACGGTACTTTTAGGAGGTCTTA	724
<i>Rickettsia monacensis</i> (IrR/Munich)2	TTAACGGTACTTTTAGGAGGTCTTA	724

Tabelle 21: Prozentualer Anteil infizierter *Ixodes ricinus* je Standort, Monat und Entwicklungsstadium

Standort	Monat	Jahr	<i>A. phagocytophilum</i>			<i>Rickettsia</i> spp.			LP (L)	<i>Babesia</i> spp			LP (L)
			A/w	A/m	N	A/w	A/m	N		A/w	A/m	N	
M1	April	2009	3,3	13,3	-	13,3	3,3	-	-	-	-	-	-
	Mai	2009	6,7	13,3	-	13,3	13,3	10	-	-	-	-	-
	Juni	2009	13,3	23,3	6,7	16,7	16,7	13,3	-	-	-	-	-
	Juli	2009	13,3	6,7	4,2	26,7	3,3	4,2	-	-	-	-	-
	September	2009	6,7	6,7	-	16,7	10	16,7	-	3,3	-	-	-
M2	April	2009	16,7	3,3	-	3,3	-	-	-	-	-	-	-
	Mai	2009	16,7	20	8,7	3,3	3,3	13	-	-	-	-	-
	Juni	2009	6,7	27,6	3,3	3,3	3,4	6,7	3,3-16,7	-	3,4	-	-
	Juli	2009	10	16,7	6,7	3,3	13,3	13,3	3,3-16,7	-	-	-	-
	August	2009	30	31,6	10	3,3	10,5	3,3	-	-	-	-	-
	September	2009	6,7	26,9	13,3	-	11,5	3,3	-	-	-	-	-
	Mai	2010	16,7	16,7	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	-	-	-
	Juni	2010	10	6,7	3,3	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	-	-	-
	Juli	2010	10	-	10	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	-	-	-
	September	2010	3,8	10,3	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	-	-	-
M3	April	2010	6,7	5,9	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	-	-	-
	Mai	2009	3,3	10	3,3	6,7	6,7	6,7	-	3,3	6,7	-	-
	Juni	2009	6,7	3,3	3,3	13,3	6,7	10	-	-	-	3,3	-
	Juli	2009	10	6,7	-	13,3	10	3,3	-	-	-	-	-
	August	2009	3,3	3,3	6,7	13,3	10	3,3	11,1-55,6	-	3,3	-	-
	September	2009	16,7	3,3	-	6,7	10	-	3,3-16,7	-	-	-	-
	Mai	2010	3,3	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	-	-	-
	Juni	2010	3,3	6,7	3,3	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	3,3	-	-	3,4-17,2
	Juli	2010	6,7	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	3,3	-	-
	September	2010	3,3	6,7	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	3,3	6,7	-	-
R1	April	2010	9,5	18,2	3,3	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	-	-	-
	April	2009	6,7	21,7	6,3	13,3	-	6,3	-	-	-	-	-
	Mai	2009	26,7	26,7	-	10	3,3	16	-	-	-	-	-
	Juni	2009	23,3	16,7	3,8	-	16,7	3,8	-	-	-	-	-
	Juli	2009	8,7	25	5,6	-	4,2	11,1	-	-	-	-	-
	August	2009	14,3	10	13,3	-	3,3	3,3	-	-	-	-	-
	September	2009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mai	2010	20	13,3	3,3	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	-	-	-
	Juni	2010	16,7	16,7	23,3	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	3,3	3,3	-	-
	September	2010	13,3	16,7	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	-	-	-
R2	April	2009	13,6	26,7	-	13,6	-	-	-	-	-	-	-
	Mai	2009	10	20	5	3,3	3,3	10	-	-	-	-	-
	Juni	2009	13,3	20	-	-	3,3	10	-	3,3	-	-	-
	Juli	2009	16,7	10	6,7	8,3	20	6,7	-	10	-	-	-
	September	2009	10	14,3	-	-	-	3,3	12,5	-	-	-	12,5-25
I1	April	2009	-	-	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mai	2009	13,3	10	-	-	-	16,7	-	-	-	-	-
	Juni	2009	13,3	3,3	3,3	6,7	-	16,7	-	-	-	-	-
	Juli	2009	6,7	6,7	-	6,7	3,3	10	-	-	-	-	-
	August	2009	20	10	16,7	10	10	3,3	-	-	-	-	-
	September	2009	16,7	16,7	16,7	8,3	10	3,3	3,3-16,7	-	-	-	-
	Mai	2010	11,8	23,5	-	-	-	-	3,3-16,7	-	-	-	-
	Juni	2010	10	6,7	6,7	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	-	-	-
	Juli	2010	-	6,7	3,3	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	3,3	-	-
	September	2010	-	4,8	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	-	-	-
I2	April	2010	20	22,2	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	-	-	-
	September	2010	33,3	-	6,7	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	-	-	-
	April	2009	6,7	6,7	10,3	3,3	10	-	-	-	-	-	-
	Mai	2009	10	10	-	6,7	13,3	-	5,9-29,4	-	-	-	-
	September	2009	10	22,2	3,3	3,3	11,1	-	-	-	-	-	-
A	Juni	2009	6,7	10	-	13,3	16,7	16	-	-	-	-	-
	Juli	2009	6,7	10,3	-	10	13,8	-	18,2-90,9	3,3	-	-	-
	August	2009	10	7,4	6,7	10	7,4	10	6,7-33,3	-	3,7	-	-
	September	2009	10	22,2	3,3	3,3	11,1	-	-	-	-	-	-
	Mai	2009	30	23,3	-	-	-	10,5	-	-	-	-	-
B	Juni	2009	4,5	-	3,3	4,5	16,7	10	3,3-16,7	-	-	-	-
	Juli	2009	12,5	-	-	16,7	-	25	-	-	-	-	-
	August	2009	10	-	21,4	-	-	14,3	-	-	-	-	-
	September	2009	50	-	-	-	-	-	10-50	-	-	-	-
	Mai	2009	10	-	6,7	6,7	13,3	3,3	-	3,3	-	-	-
	Juni	2009	-	16,7	3,3	16,7	10	6,7	-	-	3,3	6,7	-
	Juli	2009	6,7	10	10	13,3	10	13,3	-	-	-	-	-
	August	2009	-	8,3	13,6	-	-	9,1	-	7,7	-	-	-
	September	2009	16,7	27,3	3,3	-	-	16,7	-	-	-	-	-
	Mai	2010	3,3	26,7	10	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	-	3,3	-
Juni	2010	6,7	3,3	3,3	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	-	-	-	
Juli	2010	5,3	42,9	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	-	3,3	-	
August	2010	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	-	-	-	
September	2010	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	-	-	-	

LP: Larvenpool; L: Larvenanzahl; n.u.: nicht untersucht

Tabelle 22: Gesamtmodell der logistischen Regression mit allen Interaktionen bezüglich Untersuchungsjahr, Entwicklungsstadium, Monat und Standort

	P						
	<i>Babesia</i> spp.			<i>A. phagocytophilum</i>			<i>Rickettsia</i> spp.
	2009 ^a	2010 ^a	gesamt ^a	2009 ^b	2010 ^a	gesamt ^b	2009 ^b
Jahr 2010			0,7701			0,0002 ***	
Adult/männlich	0,2827	0,4180	0,1896	0,1700	0,7082	0,1803	0,9027
Nymphe	0,3794	0,5500	0,2862	4,78 e-9 ***	0,0006 ***	9,58 e-12 ***	0,6897
Larve	0,1740	0,7200	0,2271				4,96 e-6 *** ^c
Mai				0,2545		0,1567	0,0523
Juni	0,5102	0,1250	0,1158	0,9534	0,3927	0,8369	0,0028 **
Juli	0,7510	0,4800	0,7938	0,4835	0,0442 *	0,8039	0,0020 **
August	0,6052	0,1970	0,2204	0,1461	0,1098	0,3357	0,05853
September	k.V.	k.V.	k.V.	0,1435	0,5953	0,1493	0,7523
Standort B				0,3084		0,5390	0,7279
Standort I1	0,9880	0,4340	0,0258 *	0,9556	0,5722	0,8380	0,3712
Standort I2	0,1446		0,3221	0,1717		0,2030	0,3432
Standort M1	0,0625		0,1528	0,4439		0,5041	0,0546
Standort M2	0,0550	0,9910	0,0217 *	0,1982	0,9681	0,3718	0,3115
Standort M3	0,7789	0,4590	0,7004	0,0081 **	0,0623	0,0061 **	0,8633
Standort R1	0,9884	0,7050	0,0403 *	0,1653	0,0110 *	0,0337 *	0,2206
Standort R2	0,6167		0,9842	0,6923		0,6957	0,0731

^a Referenzvariablen: Adult/weiblich, Mai und Standort B

^b Referenzvariablen: Adult/weiblich, April und Standort A

^c diese Variablenausprägung wurde nicht in den Ergebnisteil übernommen. Grundlage dafür ist die Minimalinfektionsrate der Larven, die aufgrund der transovariellen Transmission von *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* nicht denen in der Natur vorkommenden Verhältnissen entspricht. Bei Infektion von zwei oder mehr Larven pro Larvenpool verschwindet der Effekt.

k.V.: gegen diese Varianzausprägung beinhaltet der Response keine Varianz, eine Parameterabschätzung war daher nicht möglich

Tabelle 23: Jährlicher Vergleich (2009 zu 2010) der Standorte bezüglich Anaplasma phagocytophilum

Standort	P				
	B	M2	M3	I1	R1
	0,6961	0,1405	0,9966	0,4266	0,4677

Tabelle 24: Modell simultaner paarweiser Tests mit Tukey Kontrasten (Entwicklungsstadium der Zecke)

	P						
	<i>Babesia</i> spp.			<i>A. phagocytophilum</i>			<i>Rickettsia</i> spp.
	2009 ^a	2010 ^a	gesamt ^a	2009 ^b	2010 ^a	gesamt ^b	2009 ^b
M – W == 0	0,6940	0,8450	0,5436	0,3520	0,9254	0,3700	0,9990
N – W == 0	0,8070	0,9310	0,7004	<1 e-4 ***	0,0018 **	<1 e-4 ***	0,9770
N – M == 0	0,2390	0,5200	0,0998	<1 e-4 ***	<0,0010	<1 e-4 ***	0,9920
N – L == 0	0,8770	1,0000	0,9750				<1 e-4 *** ^c
M – L == 0	0,1850	0,7910	0,1679				<1 e-4 *** ^c
L – F == 0	0,5110	0,984	0,6108				<1 e-4 *** ^c

W: Adult/weiblich; M: Adult/männlich; N: Nymphe; L: Larve

^c diese Variablenausprägung wurde nicht in den Ergebnisteil übernommen. Grundlage dafür ist die Minimalinfektionsrate der Larven, die aufgrund der transovariellen Transmission von *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* nicht denen in der Natur vorkommenden Verhältnissen entspricht. Bei Infektion von zwei oder mehr Larven pro Larvenpool verschwindet der Effekt.

**Tabelle 25: Modell simultaner paarweiser Tests mit Tukey Kontrasten
(Monat der Sammlung)**

	p						
	<i>Babesia</i> spp.			<i>A. phagocytophilum</i>			<i>Rickettsia</i> spp.
	2009 ^a	2010 ^a	gesamt ^a	2009 ^b	2010 ^a	gesamt ^b	2009 ^b
Mai – April == 0	k.V.		k.V.	0,8630		0,7120	0,3646
Juni – April == 0	k.V.		k.V.	1,0000		1,0000	0,0314 *
Juli – April == 0	k.V.		k.V.	0,9820		1,0000	0,0228 *
August – April == 0	k.V.		k.V.	0,6910		0,9280	0,3946
September – April == 0	k.V.		k.V.	0,6850		0,6960	0,9996
Juni – Mai == 0	0,9120	0,4070	0,3910	0,7190	0,9120	0,5560	0,6645
Juli – Mai == 0	0,9890	0,8910	0,9940	0,9970	0,2560	0,6500	0,5584
August – Mai == 0	0,9550	0,5600	0,6080	0,9980	0,4930	0,9950	1,0000
September – Mai == 0	k.V.	k.V.	k.V.	0,9930	0,9840	1,0000	0,4986
Juli – Juni == 0	0,7810	0,7630	0,5840	0,9520	0,7370	1,0000	0,9999
August – Juni == 0	1,0000	0,9950	0,9940	0,5050	0,9050	0,9180	0,6736
September – Juni == 0	k.V.	k.V.	k.V.	0,5310	1,0000	0,6120	0,0402 *
August – Juli == 0	0,8550	0,8980	0,7750	0,9580	0,9990	0,9450	0,5697
September – Juli == 0	k.V.	k.V.	k.V.	0,9370	0,8050	0,6720	0,0295 *
September – August == 0	k.V.	k.V.	k.V.	1,0000	0,9180	0,9840	0,5293

k.V.: gegen diese Varianzausprägung beinhaltet der Response keine Varianz, eine Parameterabschätzung war daher nicht möglich

**Tabelle 26: Modell simultaner paarweiser Tests mit Tukey Kontrasten
(Standort)**

	p						
	<i>Babesia</i> spp.			<i>A. phagocytophilum</i>			<i>Rickettsia</i> spp.
	2009 ^a	2010 ^a	gesamt ^a	2009 ^b	2010 ^a	gesamt ^b	2009 ^b
B – A == 0	k.V.		k.V.	0,9837		0,9995	1,0000
I1 – A == 0	k.V.		k.V.	1,0000		1,0000	0,9931
I2 – A == 0	k.V.		k.V.	0,9080		0,9362	0,9898
M1 – A == 0	k.V.		k.V.	0,9976		0,9990	0,5918
M2 – A == 0	k.V.		k.V.	0,9337		0,9930	0,9843
M3 – A == 0	k.V.		k.V.	0,1621		0,1282	1,0000
R1 – A == 0	k.V.		k.V.	0,9005		0,4460	0,9497
R2 – A == 0	k.V.		k.V.	1,0000		1,0000	0,6814
I1 – B == 0	1,0000	0,9200	0,3080	0,9695	0,9796	0,9998	0,9006
I2 – B == 0	0,7720		0,9720	1,0000		0,9964	0,9990
M1 – B == 0	0,4920		0,8260	1,0000		1,0000	0,6796
M2 – B == 0	0,4520	1,0000	0,2720	0,1745	1,0000	0,5086	0,8424
M3 – B == 0	1,0000	0,9330	1,0000	0,7016	0,3324	0,1682	1,0000
R1 – B == 0	1,0000	0,9940	0,4180	0,1620	0,0798	0,0079 **	0,7376
R2 – B == 0	0,9990		1,0000	0,8424		0,9661	0,3638
I2 – I1 == 0	1,0000		0,9020	0,8102		0,9030	0,4502
M1 – I1 == 0	1,0000		0,9990	0,9952		0,9996	0,0359 *
M2 – I1 == 0	1,0000	1,0000	1,0000	0,7452	0,9665	0,7945	1,0000
M3 – I1 == 0	1,0000	0,5270	0,1910	0,0659	0,6688	0,0236 *	0,9514
R1 – I1 == 0	1,0000	0,9870	0,9990	0,6985	0,0123 *	0,0191 *	1,0000
R2 – I1 == 0	1,0000		0,4410	0,9998		0,9984	0,9746
M1 – I2 == 0	0,9960		0,9990	0,9992		0,9992	0,9543
M2 – I2 == 0	0,9950		0,8800	0,0310 *		0,1301	0,3557
M3 – I2 == 0	0,8810		0,9030	0,8309		0,7703	0,9920
R1 – I2 == 0	1,0000		0,9910	0,0329 *		0,0011 **	0,2840
R2 – I2 == 0	0,9730		0,9860	0,5607		0,6324	0,0935
M2 – M1 == 0	1,0000		0,9980	0,2727		0,6146	0,0236 *
M3 – M1 == 0	0,6050		0,7060	0,4730		0,3535	0,4971
R1 – M1 == 0	1,0000		1,0000	0,2375		0,0269 *	0,0195 *
R2 – M1 == 0	0,7780		0,8730	0,9341		0,9600	0,0059 **
M3 – M2 == 0	0,5680	1,0000	0,1630	<0,010 ***	0,2395	<0,001 ***	0,9120
R1 – M2 == 0	1,0000	1,0000	0,9980	1,0000	0,0395 *	0,5747	1,0000
R2 – M2 == 0	0,7480		0,4030	0,9880		0,9999	0,9868
R1 – M3 == 0	1,0000	0,6890	0,2230	<0,010 ***	<0,001 ***	<0,001 ***	0,8261
R2 – M3 == 0	1,0000		1,0000	0,0308		0,0149	0,4522
R2 – R1 == 0	1,0000		0,6360	0,9752		0,5844	0,9989

k.V.: gegen diese Varianzausprägung beinhaltet der Response keine Varianz, eine Parameterabschätzung war daher nicht möglich

13 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Kurt Pfister bedanken, nicht nur für die Möglichkeit am Lehrstuhl für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie meine Doktorarbeit anzufertigen, sondern auch für sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Als nächstes geht mein Dank an meine Betreuerin, Frau Dr. Cornelia Silaghi, die mir eine unschätzbare Hilfe in allen Bereichen dieser Arbeit war. Neben der guten fachlichen Beratung möchte ich mich auch für ihre stets geduldige und motivierende Unterstützung bei der Erstellung und Korrektur der Manuskripte und der Doktorarbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Holger Reulen, Frau Monia Mahling, Frau Juliane Manitz und Prof. Dr. Helmut Küchenhoff vom Statistischen Beratungslabor der Ludwig-Maximilians-Universität München für die statistische Analyse meiner Daten.

Frau Claudia Thiel möchte ich danken, dass sie mir nicht nur alle notwendigen Kenntnisse der molekularen Arbeitstechniken gewissenhaft beigebracht hat, sondern mir auch in manch stressigen Momenten im Labor und im Feld tatkräftig zur Seite stand. An Frau Dr. Miriam Scheuerle geht ein besonderer Dank für ihre „Rückendeckung“ an den langen und anstrengenden Tagen vor dem Computer.

Einen herzlichen Dank geht an alle weiteren Mitarbeiter des Lehrstuhls für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie für den guten kollegialen Zusammenhalt, stete Unterstützung und eine herzliche Arbeitsatmosphäre.

Mein persönlicher Dank geht an meine Familie und Freunde, die mich während der langen Zeit des Studiums und der Doktorarbeit durchgehend motiviert und unterstützt haben.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN: 978-3-8359-5869-2

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de



9 783835 119586 9 2