

Zecken-übertragene Anaplasmataceae und *Babesia microti* in
Kleinsäugetern und ihren Zecken an Standorten mit unterschiedlicher
Habitatstruktur

von Anna Obiegala

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

Zecken-übertragene Anaplasmatataceae und *Babesia microti* in
Kleinsäugetern und ihren Zecken an Standorten mit unterschiedlicher
Habitatstruktur

von Anna Obiegala
aus Piekary Śląskie, Polen

München 2015

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

Lehrstuhl für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Cornelia Silaghi

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Cornelia Silaghi

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer
Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger
Univ.-Prof. Dr. Dr. Michael H. Erhard
Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Müller

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

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

Für meine Eltern und meine Bruder Andreas

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Pathogene	3
1.1.	<i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>	3
1.1.1.	Taxonomie, Morphologie	3
1.1.2.	Entwicklungszyklus, Reservoirwirte	3
1.1.3.	Klinische Fälle, Klinik, Nachweis, Verbreitung	4
1.1.4.	Kleinsäuger als Reservoir	5
1.2.	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	6
1.2.1.	Taxonomie, Morphologie	6
1.2.2.	Entwicklungszyklus, Reservoirwirte	6
1.2.3.	Klinische Fälle, Klinik, Nachweis, Verbreitung	8
1.2.4.	Kleinsäuger als Reservoir	10
1.3.	<i>Babesia microti</i>	11
1.3.1.	Taxonomie, Morphologie	11
1.3.2.	Entwicklungszyklus, Reservoirwirte	11
1.3.3.	Klinische Fälle, Klinik, Nachweis, Verbreitung	12
1.3.4.	Kleinsäuger als Reservoir	14
2.	Kleinsäuger	15
2.1.	Taxonomie	15
2.2.	Vorkommen, Lebensraum, Reservoirfunktion	15
2.2.1.	Echte Mäuse, Langschwanzmäuse (Muridae)	16
2.2.1.1.	Waldmaus (<i>Apodemus sylvaticus</i>)	16
2.2.1.2.	Gelbhalsmaus (<i>Apodemus flavicollis</i>)	16
2.2.1.3.	Brandmaus (<i>Apodemus agrarius</i>)	16
2.2.2.	Wühlmäuse (Cricetidae)	17
2.2.2.1.	Rötelmaus (<i>Myodes glareolus</i>)	17
2.2.2.2.	Feldmäuse (<i>Microtus</i> spp.)	17
2.2.3.	Spitzmäuse (Soricidae)	18
2.2.3.1.	Rotzahnspitzmäuse (<i>Sorex</i> spp.)	18
3.	Zecken	18
3.1.	Taxonomie	18

3.2.	Entwicklungszyklus von <i>Ixodes ricinus</i> , <i>Ixodes trianguliceps</i> und.....	
	<i>Dermacentor reticulatus</i>	19
3.3.	Vorkommen, Verbreitung, Reservoirwirte, Vektorfunktion	20
3.3.1	Ixodidae	20
3.3.1.1.	<i>Ixodes ricinus</i>	20
3.3.1.2.	<i>Ixodes trianguliceps</i>	21
3.3.2.	Rhipicephalinae	21
3.3.2.1.	<i>Dermacentor reticulatus</i>	21
III.	MATERIAL UND METHODEN.....	23
1.	Standorte	23
1.1.	Urbaner Standort „Dörnbergpark“ R1 (Regensburg, Oberpfalz)	24
1.2.	Silvatischer Standort „Angelberger Forst“ T (Tussenhausen, Unterallgäu)..	
	24
1.3.	Renaturierter Standort „Cospudener See“ S (Landkreis Leipzig).....	25
2.	Probensammlung, Feldarbeit	26
2.1.	Kleinsäuger.....	26
2.2.	Auf den Mäusen befindliche Ektoparasiten	27
2.3.	Wirtssuchende Zecken	27
3.	Aufbereitung der Kleinsäuger- und Zeckenproben	28
3.1.	Kleinsäuger.....	28
3.1.1.	Morphologische Artenbestimmung.....	28
3.1.2.	Blutproben	30
3.1.3.	Sektion der Kleinsäuger	30
3.1.4.	Aufbereitung von Organproben.....	31
3.1.4.1.	Milzen.....	31
3.1.4.2.	Gonaden.....	31
3.1.4.3.	Neonaten.....	31
3.2.	Aufbereitung von Zecken	31
3.2.1.	Morphologische Bestimmung	31
3.2.2.	Auswahl von Zeckenproben.....	32
3.2.3.	Aufbereitung von Zeckenproben.....	32
4.	Molekularbiologische Untersuchungen.....	33
4.1.	DNA-Extraktion	33

4.2.	Polymerase-Kettenreaktion	33
4.2.1.	Auswertung konventioneller PCR-Produkte	37
4.2.1.1.	Gel-Elektrophorese.....	37
4.2.1.2.	Aufreinigung von PCR-Produkten	37
4.2.1.3.	Sequenzierung und Auswertung von Sequenzen	38
5.	Statistische Auswertung.....	38
IV.	ERGEBNISSE	39
1.	Publikation 1	40
2.	Publikation 2	66
V.	DISKUSSION	81
VI.	SCHLUSSFOLGERUNG	88
VII.	ZUSAMMENFASSUNG.....	89
VII.	SUMMARY	91
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	93
IX.	ANHANG	123
X.	DANKSAGUNG	138

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>A. phagocytophilum</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>
Ap.	<i>Apodemus</i>
Aq. Dest.	Destilliertes Wasser
<i>B. microti</i>	<i>Babesia microti</i>
BLASTn	Basic local alignment search tool
bp	Base pair(s) (Basenpaare)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CI	Konfidenzintervall
CNM	<i>Candidatus</i> Neoehrlichia mikurensis
CO ₂	Carbon dioxide (Kohlenstoffdioxid)
CPXV	Cowpox virus (Kuhpocken-Virus)
Ct-Wert	cycle threshold (Zyklusschwellenwert)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	desoxyribonucleic triphosphat
DOBV	Dobrava-Belgrad-Virus
<i>D. reticulatus</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i>
et al.	und andere
<i>F.</i>	<i>Francisella</i>
FSME(V)	Frühsommer-Meningoencephalitis(Virus)

g	Gramm
gltA Gen	Citrat Synthase Gen
ha	Hektar
HGA	humane granulozytäre Anaplasnose
<i>I. ricinus</i>	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>I. trianguliceps</i>	<i>Ixodes trianguliceps</i>
m	Meter
m ²	Quadratmeter
<i>My. glareolus</i>	<i>Myodes glareolus</i>
<i>M. agrestis</i>	<i>Microtus agrestis</i>
<i>M. arvalis</i>	<i>Microtus arvalis</i>
ml	Milliliter
min	Minute
mM	millimolar
mm	Millimeter
<i>msp2</i>	Major surface protein 2
n	Number (Anzahl)
ng	nanogramm
NCBI	National Center for Biotechnology Information
p. i.	post infectionem
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction

PUUV	Puumala Virus
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
<i>S. araneus</i>	<i>Sorex araneus</i>
<i>S. coronatus</i>	<i>Sorex coronatus</i>
sek	Sekunden
spp.	species pluralis
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
U	Units
u. a.	unter anderem
ü. NHN	über Normalhöhennull
V	Volt
µl	mikroliter
µm	mikrometer
<i>18S rRNA</i>	18S ribosomale Ribonukleinsäure (S steht für Svedberg unit)
<i>16S rRNA</i>	16S ribosomale Ribonukleinsäure (S steht für Svedberg unit)

I. EINLEITUNG

Kleinsäuger spielen eine große Rolle in der Verbreitung und der Entwicklung von subadulten Schildzeckenstadien, die vornehmlich auf Kleinnagern parasitieren (Vayssier-Taussat et al., 2012; Fehr et al., 2010). Aus diesem Grund stellen Kleinsäuger potentielle Reservoirwirte für Zecken-übertragene Krankheitserreger dar und sind so von großer Bedeutung für den Erhalt und die Verbreitung dieser Pathogene. In vorangegangenen Studien unserer Forschungsgruppe wurden in wirtssuchenden Zecken an einem urbanen und einem silvatischen Standort in Bayern *Babesia microti* und *Anaplasma phagocytophilum* nachgewiesen (Overzier et al., 2013a; b; c; Schorn et al., 2011a). Dabei war die Prävalenz in wirtssuchenden Zecken am urbanen Standort signifikant höher als am silvatischen. Außerdem wurde *A. phagocytophilum*, jedoch nicht *B. microti*, auch in Rehwild am silvatischen Standorte detektiert (Overzier et al., 2013b). Da das Vorkommen von Großwild nur für diesen Standort bestätigt wurde, es jedoch am urbanen Standort ebenfalls Vorkommen von *A. phagocytophilum* und *B. microti* in wirtssuchenden Zecken gab, wurden Kleinsäuger als Reservoirwirte an beiden Standorten vermutet (Overzier et al., 2013a; c). Die Verbreitung für *Candidatus Neohhrlichia mikurensis* (CNM) wurde bisher weder in wirtssuchenden Zecken noch in möglichen Reservoirwirten an diesen beiden bayrischen Standorten bestimmt. Weiterhin wurden an einem Standort in Sachsen Kleinsäuger und Zecken auf CNM, *A. phagocytophilum* und *Babesia* spp. untersucht (Silaghi et al., 2012b; c) und hohe Prävalenzen für CNM in Nagern und deren Zecken gefunden. Die genannten Zecken-übertragenen Krankheitserreger stellen ein mögliches Risiko für die Gesundheit von Mensch und Tier dar. CNM ist ein in den letzten beiden Dekaden immer häufiger nachgewiesenes Pathogen, das schwerwiegende Symptome beim Menschen verursachen kann (Maurer et al., 2013). Die Übertragungswege dieses Erregers sind bisher nicht geklärt, jedoch wird angenommen, dass Kleinsäuger wie Rötelmäuse (*Myodes glareolus*) als Reservoir für CNM dienen (Jahfari et al., 2012). *Anaplasma phagocytophilum* ist verantwortlich für die granulozytäre Anaplasmosose beim Menschen (Petrovec et al., 1997). Aber auch domestizierte Tiere wie Hunde (*Canis lupus familiaris*) und Rinder (*Bos taurus*) (Nieder et al., 2012; Silaghi et al., 2011f) können durch dieses Bakterium erkranken. Während Wildwiederkäuer als mögliches Hauptreservoir für *A. phagocytophilum* in Mitteleuropa angesehen werden (Alberdi et al., 2000; Silaghi et al., 2011b; Overzier et al., 2013b), wird die Rolle von unterschiedlichen Kleinsäugerarten als Reservoir ebenfalls vermutet (Bown et al., 2003; Woldehiwet, 2010). Protozoen der Spezies *Babesia microti* sind vor allem in den USA

für schwere Erkrankungen der humanen Babesiose verantwortlich (Homer et al., 2000; Kjemtrup und Conrad, 2000). In Europa wurde im Jahr 2007 der erste durch *B. microti* verursachte humane Babesiose-Fall beschrieben (Hildebrandt et al., 2007). Auch für *B. microti* sind Kleinsäuger das Hauptreservoir (Bown et al., 2008). *Ixodes ricinus* dient als Vektor für *A. phagocytophilum* und wird diskutiert ebenfalls *B. microti* und CNM zu übertragen (Woldehiwet, 2010; Welc-Falęciak et al., 2008; Jahfari et al., 2012). *Ixodes trianguliceps* und *Dermacentor reticulatus* Zecken werden ebenfalls als Vektoren für diese Krankheitserreger vermutet (Bown et al., 2003; 2008; Karbowski et al., 2004; Matsumoto et al., 2009). Jedoch wurde in keiner dieser Zeckenarten bisher eine transovarielle Übertragung für die genannten Krankheitserreger beschrieben (Woldehiwet, 2010; Jahfari et al., 2012; Homer et al., 2000). Somit sind Kleinsäuger als potentielle Reservoirwirte gerade für die Übertragung und den Erhalt dieser Zecken-übertragenen Pathogene wichtig.

Da Kleinsäuger allgemein und insbesondere an den zu untersuchenden Standorten als Reservoir und deren Zecken als Vektoren diskutiert werden, waren die Ziele dieser Studie:

- (1) Das Vorkommen von CNM, *A. phagocytophilum* und *B. microti* in wildlebenden Kleinsäufern und den auf ihnen befindlichen Zeckenarten festzustellen
- (2) Den Einfluss der unterschiedlich strukturierten Habitats in Zusammenhang mit den Prävalenzen der Pathogene in Reservoirtieren und Vektoren zu beurteilen
- (3) Prävalenzraten für CNM in wirtssuchenden Zecken an den Standorten festzustellen und einen Vergleich zwischen den Jahren und Standorten anzustellen
- (4) Die Rolle der Kleinnager als Reservoirwirt und die der Zecken als Vektor für die beschriebenen Pathogene zu evaluieren und dadurch mögliche Übertragungswege aufzuzeigen.

Ergebnisse dieser Studie sollen einen Beitrag zum aktuellen Wissensstand über die Verbreitung von Zecken-übertragenen Pathogenen in Kleinnagern und an ihnen saugenden Zecken leisten, um so die Bedeutung der Kleinsäuger als Reservoirwirte bzw. ihrer Zecken als Vektoren für die zu untersuchenden Pathogene besser beurteilen zu können.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Pathogene

1.1. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*

1.1.1. Taxonomie, Morphologie

CNM wurde in den späten 90er Jahren des letzten Jahrhunderts erstmals beschrieben. Aus diesem Grund ist bisher nur wenig über dieses in den letzten beiden Jahrzehnten immer häufiger nachgewiesene Pathogen bekannt. CNM wird wohl bald aufgrund seiner Eigenschaften neben *Candidatus Xenohalictis californiensis* (Friedman et al., 2000) zu der Familie der Anaplasmataceae, der die Genera *Anaplasma*, *Wolbachia*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* und *Aegyptianella* angehören, zählen. Für drei dieser fünf Genera (*Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*) sind serologische Kreuzreaktionen mit CNM nachweislich nicht beschrieben (Kawahara et al., 2004). CNM ist, wie die anderen Gattungen dieser Familie, ein gram-negatives, obligat anaerob und intrazellulär wachsendes α -Proteobakterium mit endotheliale Zelltropismus. Neben der Zellmembran hat dieses Bakterium eine weitere, äußere wellenförmige Membran. Da die Anzucht von CNM *in vitro* bisher nicht gelungen ist, behält dieses Bakterium vorläufig den Beinamen „*Candidatus*“. In einer Studie von 1999 wurde eine nicht taxonomisch gruppierte *Ehrlichia*-ähnliche DNA in gesogenen Zecken von Rehwild aus den Niederlanden beschrieben und nach einem ihrer Seniorauthoren als „Schotti-Variant“ benannt (Schouls et al., 1999). In den darauffolgenden Jahren wurden ähnliche DNA-Sequenzen in *I. ricinus* und *I. persulcatus* Zecken aus Deutschland, Italien bzw. dem Baltikum (Alekseev et al., 2001; Sanogo et al., 2003; von Loewenich et al., 2010) nachgewiesen. Es folgten erste Untersuchungen in wildlebenden Wanderratten (*Rattus norvegicus*) als mögliche Reservoirwirte, in denen DNA dieses Erregers detektiert wurde (Kawahara et al., 2004; Pan et al., 2003). CNM wurde daraufhin in Wistar-Ratten passagiert und Untersuchungen zur Ultrastruktur und phylogenetischen Analyse wurden durchgeführt (Kawahara et al., 2004).

1.1.2. Entwicklungszyklus, Reservoirwirte

Da CNM *in vitro* noch nicht angezüchtet werden konnte, ist nicht genau bekannt wie sich dieses Bakterium entwickelt und verbreitet. Es ist jedoch davon auszugehen, dass CNM durch Zecken, insbesondere *I. ricinus* übertragen wird (Jahfari et al., 2012). Außerdem wurde CNM

in *I. persulcatus* und in *I. ovatus* Zecken aus Russland bzw. aus Japan nachgewiesen (Kawahara et al., 2004; Shpynov et al., 2006), was diesen Zeckenarten ebenfalls eine potentielle Vektorfunktion zukommen lässt. Hauptreservoir sind vermutlich Kleinsäuger, was im Kapitel 1.1.4. näher behandelt wird.

1.1.3. Klinische Fälle, Klinik, Nachweis, Verbreitung

In vergangenen Studien wurde CNM bisher in Menschen detektiert, jedoch lange ohne klinische Relevanz (Beninati et al., 2006; Jahfari et al., 2012). Klinische Fälle wurden erstmals 2010 veröffentlicht, dabei handelte es sich um zwei immunsupprimierte Patienten, die 2008 und 2007 an CNM erkrankten und von denen einer trotz Intensivtherapie nicht überlebte (von Loewenich et al., 2010). Es folgten klinische Fallberichte in immunsupprimierten Patienten aus der Schweiz, der Tschechischen Republik und Schweden (Fehr et al., 2010; Pekova et al., 2011; Welinder-Olsson et al., 2010). Bei den Patienten wurden unspezifische Symptome wie Übelkeit, Fieber, Gewichtsverlust und Septikämie festgestellt (Fehr et al., 2010; von Loewenich et al., 2010; Welinder-Olsson et al., 2010). Die bisher beschriebenen Fälle wurden bei Patienten mit vorausgehenden Primärerkrankungen diagnostiziert. Jedoch ist eine Primärerkrankung keine Grundvoraussetzung um an Neoehrlichiose zu erkranken. In China wurde im Jahr 2012 in 7 von 622 Patienten mit Fieber CNM im Blut nachgewiesen (Li et al., 2012). Die Autoren dieser Fallberichte betonten hierbei, dass die Patienten zuvor gesund waren und an keiner chronischen bzw. immunsupprimierenden Grunderkrankung litten. In der Schweiz wurden die aktuellsten zwei klinischen Neoehrlichiose-Fälle publiziert (Maurer et al., 2013). Die Erkenntnisse, die in den letzten Jahrzehnten über CNM gewonnen wurden, lassen vermuten dass CNM ein in Zukunft immer häufiger nachgewiesenes Pathogen sein wird. Es ist wahrscheinlich, dass zukünftig steigende Prävalenzen in Zecken und Kleinsäufern festgestellt werden und dass CNM auch häufiger in klinischen Fällen beim Menschen diagnostiziert wird (Jahfari et al., 2012; Rar et al., 2011). Außerdem wurde im Jahr 2007 CNM erstmals in einem Hund mit klinischen Symptomen und Blutveränderungen aus Deutschland nachgewiesen (Diniz et al., 2011). In einer Studie aus den Niederlanden wurden gesaugte *I. ricinus* Zecken von Hausschafen (*Ovis orientalis aries*), Mufflons (*Ovis orientalis musimon*), Rothirschen (*Cervus ephalus*) und Wildschweinen (*Sus scrofa*) untersucht, die ebenfalls zu einer Prävalenz von 4,0-12,9 % für CNM positiv waren (Jahfari et al., 2012). In Tabelle 1 ist die Verbreitung von CNM in *I. ricinus* Zecken in Europa dargestellt.

Tabelle 1 Vorkommen von *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in wirtssuchenden *Ixodes ricinus* Zecken aus unterschiedlichen Habitaten in Europa (Auszug)

Land	Art des Habitats	Anzahl positiver / untersuchter Zecken	Prävalenz (%)	Referenz
Deutschland	urban und silvatisch	44/542	8,1	Richter u. ¹ Matuschka, 2012
	periurban und silvatisch (Sachsen)	63-67/172	36,6-39,0	Silaghi et al., 2012c
	periurban und silvatisch (Bayern)	11/128	8,6	Silaghi et al., 2012c
Frankreich	silvatisch	1/60	1,7	Richter u. Matuschka, 2012
Italien	urban und silvatisch	14/138	10,1	Capelli et al., 2012
Slowakei	urban und silvatisch	16/670	2,4	Pangráčová et al., 2013
Ungarn	urban und silvatisch	9/35*	25,7	Hornok et al., 2013
Niederlande	urban und silvatisch	299/5343	5,6	Coipan et al., 2013
Österreich	urban	22/518	4,2	Glatz et al., 2014
Spanien	periurban	2/100	2,0	Palomar et al., 2014
Tschechien	urban	1/69	1,4	Derdáková et al., 2014
Schweden	silvatisch	60/949	6,3	Andersson et al., 2013
Schweiz	urban und silvatisch	51/818	6,4	Lommano et al., 2012

*9 von 35 untersuchten Habitaten positiv; ¹ u.= und

1.1.4. Kleinsäuger als Reservoir

Aufgrund hoher Prävalenzraten wurden in vergangenen Studien Kleinnager als Hauptreservoir für CNM vermutet (Andersson und Råberg, 2011), wobei unterschiedlich hohe Prävalenzen in verschiedenen Ländern gefunden wurden. So konnte CNM in Langschwanzmäusen wie Gelbhalsmäusen [(*Apodemus flavicollis*; 2,2-64,9 %) Burri et al., 2014; Silaghi et al., 2012c], Waldmäusen [(*Ap. sylvaticus*; 11,4-25,0 %) Burri et al., 2014; Jahfari et al., 2012] und Brandmäusen [(*Ap. agrarius*; 33,3 %) Silaghi et al., 2012c] nachgewiesen werden. Außerdem waren auch Wühlmäuse wie Rötelmäuse [(*My. glareolus*;

15,7-54,8 %) Andersson et al., 2013; Burri et al., 2014; Silaghi et al., 2012c], Feldmäuse (*Microtus arvalis*) und Erdmäuse [(*Microtus agrestis*; 25,0-100 %) Krücken et al., 2013] für diesen Krankheitserreger in vorangegangenen Studien positiv. Spitzmäuse hingegen gelten nicht als Reservoir (Jahfari et al., 2012). Auch in Untersuchungen aus Japan wurden Kleinsäuger als Hauptreservoir diskutiert, so wurde der Erreger dort in der kleinen japanischen Waldmaus (*Ap. argenteus*), in der großen japanischen Waldmaus (*Ap. speciosus*), in *Eothenomys smithii* und in Wanderratten (*R. norvegicus*) gefunden (Kawahara et al., 2004; Naitou et al., 2006).

1.2. *Anaplasma phagocytophilum*

1.2.1. Taxonomie, Morphologie

Anaplasma phagocytophilum ist ein gramnegatives α -Proteobakterium aus dem Genus *Anaplasma*, das wie im Kapitel 1.1.1. beschrieben zur Familie der Anaplasmataceae gehört (Dumler et al., 2001). Im Jahr 2001 fand eine taxonomische Neuorganisation der Ordnung Rickettsiales statt. Dabei wurden aufgrund von Homologien zum *16S rRNA* Gen die Arten, die für equine bzw. bovine granulozytäre Erkrankungen verantwortlich sind – *E. equi* und *E. phagocytophila* – sowie der Erreger der humanen granulozytären Ehrlichiose (HGE-Agens) zur Art *A. phagocytophilum* zusammengefasst (Dumler et al., 2001). *Anaplasma phagocytophilum* ist ein unbewegliches, pleomorphes Bakterium, das sich in eukaryotischen Wirtszellen, insbesondere in neutrophilen Granulozyten, in intrazytoplasmatischen Vakuolen vermehrt (Dumler et al., 2001; Rikihisa, 1991; 2011; Woldehiwet, 2010). Mikroskopisch sind die Erreger im gefärbten Blutaussstrich als sogenannte Morulae (Makrokolonien) zu erkennen (Rikihisa, 1991; Woldehiwet, 2010).

1.2.2. Entwicklungszyklus, Vektoren, Reservoirwirte

Der Entwicklungszyklus von *A. phagocytophilum* ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Es ist bekannt, dass dieses Pathogen durch Zecken übertragen wird. Die beim Zeckenstich von der Zecke inokulierten entzündungshemmenden Stoffe begünstigen die Übertragung von *A. phagocytophilum* auf den Wirt (Choi et al., 2003; 2004; Granquist et al., 2010). Etwa 4-7 Tage nach einem Zeckenstich kommt es zur Bakteriämie im Wirt (Woldehiwet, 2010). Welche Zellen bei der Frühphase der Infektion beteiligt sind, ist noch nicht hinreichend geklärt. Jedoch wird davon ausgegangen, dass myeloide Vorläuferzellen im Knochenmark, Lungen- und Milzzellen, wie auch mikrovaskuläre Endothelzellen für die Vermehrung des Erregers bis hin zur Bakteriämie eine Rolle spielen können (Munderloh et al., 2004; Walker

und Dumler, 1996; Woldehiwet, 2010). *Anaplasma phagocytophilum* befällt vornehmlich neutrophile und eosinophile Granulozyten, sowie Monozyten. Die Vermehrung des Erregers erfolgt durch Zweiteilung der Zellen (Choi et al., 2005; Woldehiwet, 2010; Süß et al., 2004). Durch die kurze Lebenszeit von neutrophilen Granulozyten, wird davon ausgegangen, dass diese nicht zum Erhalt der Bakterien beitragen (Herron et al., 2005). *Anaplasma phagocytophilum* moduliert die Verbreitung von infizierten Neutrophilen, indem es die Zytokinsekretion induziert (Akkoyunlu et al., 2001; Scorpio et al., 2004). Das Bakterium interagiert durch exprimierte Oberflächenproteine mit Wirtszellliganden (Granick et al., 2008). *Anaplasma phagocytophilum* reguliert die Expression des CG8 Gens in den Speicheldrüsen der Zecke herab. Ebenso wird von diesem Bakterium die Expression des T2 Gens in den Speicheldrüsen- wie auch in den Zellen des Verdauungstrakts der Zecke herunterreguliert, was eine Hemmung der Apoptose infizierter Zellen herbeiführt. Dieser Mechanismus trägt dazu bei, dass die zelluläre Abwehr in der Zecke unterwandert wird und so die Infektion in der Zecke voranschreiten kann (Ayllón et al., 2013). Die Hauptvektoren von *A. phagocytophilum* in Europa sind *I. ricinus* Zecken. Bisher wurde in diesen keine transovarielle Übertragung für dieses Pathogen nachgewiesen (Woldehiwet, 2010). Eine experimentelle transovarielle Übertragung wurde für *A. phagocytophilum* bisher nur in *Dermacentor albipictus* Zecken beschrieben (Baldrige et al., 2009), die vor allem in den USA vorkommen und fast ausschließlich auf Elchen (*Alces alces*) parasitieren (Samuel et al., 1991). So sind Reservoirwirte für den Erhalt endemischer Zyklen dieses Krankheitserregers essentiell (Doudier et al., 2010; Ogden et al., 1998). In Europa werden Großwildarten wie Rehwild (*Capreolus capreolus*), Rothirsche (*Cervus elaphus*), Sikahirsche (*Cervus nippon*) und Damhirsche (*Dama dama*) als Reservoir diskutiert (Alberdi et al., 2000; de la Fuente et al., 2005b; Hapunik et al., 2011; Michalik et al., 2009; Silaghi et al., 2011b; Žele et al., 2012). Kleinsäuger gelten als zweitwichtigstes Reservoir für dieses Bakterium (Stuen et al., 2013), was im Kapitel 1.2.4. näher thematisiert wird. Andere größere Säugetiere wie Füchse (*Vulpes vulpes*) und Wildschweine (*Sus scrofa*) (Petrovec et al., 2003; Žele et al., 2012) spielen möglicherweise ebenfalls eine Rolle als Reservoirwirte. Wirbeltiere, die zur Klasse der Vögel gehören, wie z. B. Amseln (*Turdus merula*) oder Buchfinken (*Fringilla coelebs*), werden ebenfalls als potentielle Reservoir vermutet (de la Fuente et al., 2005b). Hunde wurden vor allem in urbanen Habitaten als mögliches Reservoir diskutiert (Jensen et al., 2007; Kohn et al., 2011; Schorn et al., 2011a). In Hausschafen und Rindern kann der Erreger nach einer Infektion persistieren, was diese Spezies nicht nur zu potentiellen Hauptwirten sondern auch zu möglichen Reservoir macht (Woldehiwet, 2008; 2010). Bei *A. phagocytophilum* ist

davon auszugehen, dass unterschiedliche Genvarianten an verschiedene Vektoren und Reservoirs adaptiert sind. Es wurden kürzlich vier Ökotypen auf Basis des *groEL* Gens für *A. phagocytophilum* in Europa beschrieben: Ökotyp I hat ein weites Spektrum an verschiedenen Reservoirwirten, wobei Vögel und Nager davon ausgeschlossen sind. Dieser Ökotyp ist für Menschen gesundheitsgefährdend. Während Ökotyp II wohl an Rehwild und *I. ricinus* Zecken adaptiert ist, wird für Ökotyp III vermutet, dass diese Genvariante apathogen ist, von *I. trianguliceps* Zecken übertragen, und von Kleinnagern beherbergt wird. Ökotyp IV wird mit Vögeln aber nicht mit anderen Wirbeltieren assoziiert und es ist möglich, dass eine an Vögel adaptierte Zeckenart wie *I. frontalis* im Lebenszyklus dieses Ökotyps eine Vektorfunktion übernimmt (Jahfari et al., 2014). Eine weitere Studie zeigte anhand von Untersuchungen des *ankA* Gens, dass vor allem Rehwild und *I. ricinus* Zecken pathogene Genvarianten beherbergen. Im Gegensatz dazu wurde vermutet, dass es sich bei *A. phagocytophilum* in Spitz- und Wühlmäusen um apathogene Genvarianten handelt (von Loewenich et al., 2003; Majzki et al., 2013). Die Hypothese wurde ebenso von Studien aus der Slowakei und Norditalien gestützt (Baráková et al., 2014; Blaňarová et al., 2014). Die Weißfußmaus (*Peromyscus leucopus*) wird in den USA als Hauptreservoirwirt für die humanpathogene Genvariante „Ap-ha“ (klassifiziert nach dem *16S rRNA* Gen) angesehen (Massung et al., 2003). Die vermutlich apathogene Genvariante „Ap-V1“ wurde in Weisswedelhirschen (*Odocoileus virginianus*) und *I. scapularis* Zecken nachgewiesen. Diese konnte im Gegensatz zu humanpathogenen Genvarianten nicht in HL (Human Leukaemia)-60 Zelllinien angezüchtet werden, was die Vermutung von unterschiedlicher Wirtsspezifität dieser beiden Genvarianten zulässt (Horowitz et al., 1998; Massung et al., 2007).

1.2.3. Klinische Fälle, Klinik, Nachweis, Verbreitung

Im Jahr 1994 wurde in den USA der erste Fall von humaner granulozytärer Ehrlichiose beschrieben (Chen et al., 1994). Mittlerweile gilt diese Krankheit, die heutzutage als humane granulozytäre Anaplasiose (HGA) bekannt ist, als eine der bedeutendsten Zeckenübertragenen Erkrankungen in den USA. Mit Einführung der Meldepflicht in den USA im Jahr 1999 stieg die Inzidenzrate von nachgewiesenen *A. phagocytophilum* Erkrankungen von 1,4 Fälle/Million Einwohner/Jahr im Jahr 2000 auf 6,1 Fälle/Million Einwohner/Jahr im Jahr 2010 (CDC, 2012). In Europa wurden hingegen bis heute nur ca. 100 humane Fälle in verschiedenen Ländern wie Frankreich, Italien und Spanien beschrieben (de la Fuente et al., 2005b; García et al., 2006; Remy et al., 2003). Fälle aus Skandinavien und Slowenien, wo auch der erste in Europa aufgetretene Fall 1997 beschrieben wurde, sind bisher jedoch am häufigsten (Bjoërsdorff et al., 1999; Lotric-Furlan et al., 2006; Petrovec et al., 1997). Der

aktuellste Fall wurde in Belgien in einem 60-jährigen Patienten beschrieben (Hing et al., 2014). Ein möglicher Grund für die starke Diskrepanz zwischen der unterschiedlich hohen Anzahl an Fallberichten in Europa und den USA, liegt höchstwahrscheinlich an der geographischen Verbreitung und der unterschiedlich starken Virulenz der verschiedenen Genvarianten dieses Bakteriums (Woldehiwet, 2010). Die zahlreichen genetischen Varianten dieses Bakteriums scheinen sich bezüglich ihrer Pathogenität hinsichtlich verschiedener Wirte zu unterscheiden (de la Fuente et al., 2005a; Foley et al., 2009; Woldehiwet, 2010). Ein weiterer Grund für die unterschiedlich hohe Anzahl an Fallberichten in den USA und Europa ist, dass HGA in den USA im Gegensatz zu Europa eine meldepflichtige Erkrankung ist. Eine fieberhaften Erkrankung, der ein Kontakt zu Zecken und ein damit verbundener Zeckenstich vorausgingen, ist eine der Grundvoraussetzungen um eine gesicherte Diagnose zu stellen. Zusätzlich muss der Anaplasmenachweis serologisch und molekularbiologisch für eine gesicherte Diagnose erbracht werden. Serologisch muss in einer gepaarten Serumprobe im Abstand von 2-4 Wochen ein mindestens 4-facher Antikörpertiteranstieg nachgewiesen werden (Brouqui et al., 2004). Serumproben sind in der Regel 7-10 Tage p. i. serologisch auszuwerten, da sich erst nach dieser Zeit eine nachweisliche Immunabwehr im Wirt bildet. Der sensitivste Nachweis erfolgt mittels PCR während der Anfangsphase der Infektion (bis 7 Tage p. i.). Anaplasmen können zu Beginn einer Infektion auch im gefärbten Blutaussstrich nachgewiesen werden. Bei Hunden können Morulae bereits 4 Tage p. i. im Blutaussstrich nachweisbar sein (Sainz et al., 2015). Die klinischen Symptome beim Menschen variieren erheblich in ihrem Schweregrad. Die Infektion kann leichte unspezifische Symptome wie Unwohlsein, Kopfschmerzen und Übelkeit hervorrufen. Ernsthaftere Ausbrüche der Erkrankung äußern sich in Muskel- und Gelenkschmerzen aber auch in Nierenversagen und Hämorrhagien (Dumler et al., 2005). Aufgrund der verminderten Immunabwehr und durch den Verlust von Immunzellen kann es während der Erkrankung zu Sekundärinfektionen kommen, die ebenfalls schwerwiegende Symptome verursachen können (Woldehiwet, 2010). In seltenen Fällen können sich auch neurologische Symptome zeigen (Süss et al., 2004). Die Anaplasmosose kann, wenn die Erkrankung nicht adäquat behandelt wird, auch einen tödlichen Ausgang, sogar in zuvor gesunden Patienten, haben. Die geschätzte Fatalitätsrate liegt bei ca. 1,0 %. Veränderungen des Blutbildes wie v. a. Leukozytopenie (Gokce und Woldehiwet, 1999; Woldehiwet, 1987; 2010), Thrombozytopenie und Anämie gehen häufig mit der Erkrankung einher (Gokce und Woldehiwet, 1999; Süss et al., 2004). In Tabelle 2 wird die Verbreitung von *A. phagocytophilum* in *I. ricinus* Zecken in Europa verdeutlicht.

Tabelle 2 Vorkommen von *Anaplasma phagocytophilum* in wirtssuchenden *Ixodes ricinus* Zecken von unterschiedlichen Habitaten in Europa (Auszug)

Land	Art des Habitats bzw. Anzahl der unterschiedlichen Habitate	Anzahl positiver / untersuchter Zecken	Prävalenz (%)	Referenz
Deutschland	urban und periurban	51/1400	3,6	May und Strube, 2014
	urban und periurban	94/2100	4,5	Tappe und Strube, 2013
	silvatisch	54/1000	5,4	Hildebrandt et al., 2010
	urban	500/5569	9,0	Schorn et al., 2011a
	urban	103/2862	2,9	Silaghi et al., 2008
	unterschiedliche Habitate	47/539	8,7	Silaghi et al., 2012b
Frankreich	urban	2/558	0,7	Reis et al., 2011
	silvatisch und landwirtschaftlich genutzt	81/521 Pools*	15,0	Halos et al., 2006
Italien	31 unterschiedliche Habitate	3/193	1,5	Capelli et al., 2012
Slowakei	urban und silvatisch	24/573	4,2	Derdáková et al., 2014
	silvatisch	5/91	5,5	Pángrácová et al., 2013
	silvatisch	1075**	1,4	Víchová et al., 2014
Polen	periurban und silvatisch	24/170	14,1	Sytykiewicz et al., 2012
Ungarn	urban und silvatisch	21/240	8,8	Hornok et al., 2014
Norwegen	unterschiedliche Habitate	1/133	2,3	Soleng und Kjelland, 2013
Serbien	18 unterschiedliche Habitate	40/287	13,9	Milutinović et al., 2008
Niederlande	22 unterschiedliche Habitate	44/5343	0,8	Coipan et al., 2013
Österreich	urban	5/518	1,0	Glatz et al., 2014
Spanien	unterschiedliche Habitate	18/168	10,7	Portillo et al., 2011
Tschechien	urban und silvatisch	8/138	5,8	Derdáková et al., 2014
	urban	26/276	9,4	Venclikova et al., 2014

*mit insgesamt 4107 Zecken, **keine weitere Angabe

1.2.4. Kleinsäuger als Reservoir

Der Nachweis von *A. phagocytophilum* konnte in Kleinnagern aus Asien, Europa und den

USA erbracht werden. In Europa variierten die Prävalenzen für *A. phagocytophilum* in Waldmäusen zwischen <1,0 und 11,0 % und in Rötelmäusen zwischen 5,0 und 19,2 % (Bown et al., 2003; Liz et al., 2000; Matsumoto et al., 2007; Silaghi et al., 2012b). Studien aus Großbritannien zufolge sind Feldmäuse ebenfalls als potentielle Reservoirwirte anzusehen (Bown et al., 2003). Jedoch gibt es vergleichsweise auch Studien aus Europa in denen nur sehr geringe Infektionsraten beziehungsweise gar kein Nachweis in Kleinnagern beschrieben wurden (Hartelt et al., 2008; Barandika et al., 2007). In Europa werden Kleinsäuger, wie die Waldmaus (*Ap. sylvaticus*), die Gelbhalsmaus (*Ap. flavicollis*), die Waldspitzmaus (*Sorex araneus*) (Liz et al., 2000), die Rötelmaus (*My. glareolus*) (Hartelt et al., 2008; Liz et al., 2000), die Erdmaus (*M. agrestis*) (Hartelt et al., 2008), der Igel (*Erinaceus europaeus*) (Silaghi et al., 2012a) und der Hase (*Lepus europaeus*) (Hulínská et al., 2004) zu möglichen Reservoirs gezählt. Die Weißfußmaus (*Peromyscus leucopus*) wird als Reservoir für humanpathogene Genvarianten in den USA angesehen (Massung et al., 2003). Die Weißfußmaus ist in weiten Teilen der USA die vorherrschende Kleinsäugerart (Linzey et al., 2008) und dadurch Hauptwirt im Zusammenhang mit der Entwicklung von subadulten *I. scapularis* Zecken, die im Osten der USA zu den am häufigsten vorkommenden Zeckenarten gehören (Sonenshine, 1993). Außerdem konnte *A. phagocytophilum* auch in unterschiedlichen Langschwanz- und Wühlmausarten in den USA nachgewiesen werden, aber auch in Eichhörnchen und in *Neotoma fuscipens*, einer amerikanischen Buschrattenart. Ein mögliches Reservoir könnte außerdem der Gelbwangen-Chipmunk (*Tamias ochrogenys*) (Foley und Nieto, 2011) und das Grauhörnchen (*Sciurus carolinensis*) sein (Levin et al., 2002). Auch andere sciuruside Arten wurden besonders im Westen der USA in diesem Zusammenhang als Reservoirs diskutiert (Foley und Nieto, 2011; Nieto, 2010). In Asien konnten in Langschwanzmäusen hohe Prävalenzen gefunden werden (5,6-23,6 %), z. B. in Waldmäusen aus China mit einer Prävalenz von 10,0 % (Kim et al., 2006; Zhan et al. 2008), in koreanischen Feldmäusen (*Ap. peninsulae*) mit Prävalenzen von bis zu 25,0 % und in Brandmäusen mit einer Prävalenz von 20,8 % (Cao et al., 2006) bzw. 23,6 % (Kim et al., 2006). Somit wird vermutet, dass in Teilen Asiens Brandmäuse als Hauptreservoir dienen. Auch in Ratten wurde *A. phagocytophilum* in Asien und Europa nachgewiesen (Zhan et al., 2009; Christova und Gladnishka, 2005).

1.3. *Babesia microti*

1.3.1. Taxonomie, Morphologie

Die Gattung der Babesien, in der es mehr als 100 Arten gibt, gehört zum Reich der

Eukaryoten und dort zu den Protozoen, den Einzellern. Sie gehören zum Stamm der Apicomplexa, in die Ordnung Piroplasmida und in die Familie der Babesiidae und parasitieren in Erythrozyten (Deplazes et al., 2012; Homer et al., 2000).

Unterschieden wird morphologisch wie auch phylogenetisch zwischen kleinen (Merozoiten $<2,5 \mu\text{m}$) und großen Babesien (Merozoiten $>2,5 \mu\text{m}$), wobei den kleineren Babesienarten, insbesondere *B. microti*, eine engere Verwandtschaft zu den Theilerien zugesprochen wird (Cornillot et al., 2013; Schnittger et al., 2012). In Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen sind Babesien meist als birnen- oder tropfenförmige einzellige Gebilde zu erkennen, die sich im Erythrozyten paarweise oder aber seltener zu mehreren marginal oder zentral anordnen (Deplazes et al., 2012). Im folgenden Kapitel wird *B. microti* näher behandelt.

1.3.2. Entwicklungszyklus, Reservoirwirte

Babesia microti durchläuft eine geschlechtliche Vermehrung in Zecken und eine ungeschlechtliche im Wirtstier, wobei *Ixodes* Zecken als Vektor und vor allem Kleinsäuger als Reservoir dienen. Beim Stich einer *Ixodes* Zecke auf einem für *B. microti* geeigneten Wirt, wie Kleinsäuger in diesem Fall, inokuliert die Zecke durch ihren Speichel Sporozoiten auf das Wirtstier. Die Sporozoiten befallen im Wirt Erythrozyten und bilden dort zunächst Trophozoiten aus. Im Wirtstier kommt es zur ungeschlechtlichen Vermehrung und es entstehen Merozoiten. Diese verlassen die infizierten Zellen und befallen weitere Erythrozyten um dort erneut Merogonien einzuleiten. Zecken nehmen beim Saugakt wiederum sphäroide Merogoniestadien auf. Diese bilden sich im Darm der Zecke zu Gamonten aus. Es entwickeln sich Gametozyten die Strahlenkörper ausbilden, die wichtig für die Fusion der Gamonten sind (Kakoma und Mehlhorn, 1993; Rudzinska et al., 1983b), woraus Zygoten entstehen. Die Zygoten differenzieren sich zu Kineten und nutzen die Strahlenkörper um in die epithelialen Zellen des Verdauungstrakts der Zecken einzudringen. Daraufhin gelangen die Kineten mittels der Hämolymphe zu den Acini der Speicheldrüsen der Zecken (Rudzinska et al., 1983a), wo sie sich zu Sporokineten differenzieren (Deplazes et al., 2012; Homer et al., 2000). Aus diesen Sporokineten entwickeln sich erst beim nachfolgenden Saugakt der Zecke die Sporozoiten. Über den Speichel der Zecke erfolgt die mögliche Übertragung der Sporozoiten auf den nächsten Wirt (Deplazes et al., 2012; Süss et al., 2004). Es wird davon ausgegangen, dass der Speichel der Zecke entzündungshemmende Prozesse im Wirt in Gang setzt und eine Immunantwort verhindert, sodass die Aufnahme von *B. microti* Sporozoiten in den Wirt erleichtert wird. Eine transovariable Übertragung in Zecken wurde für große Babesien, aber nicht für *B. microti* beschrieben. Bedingt durch die transstadiale Weitergabe der Babesien scheint eine Infektion auch ohne erneute Aufnahme des Erregers mit

einer Blutmahlzeit innerhalb einer Generation von Zecken eine gewisse Zeit bestehen zu bleiben (Zintl et al., 2003). Je länger die Zecke am Wirt saugt desto wahrscheinlicher ist die Weitergabe der Sporozoiten (Homer et al., 2000). Saugt die Zecke bis zu ihrer natürlichen vollkommenen Sättigung und maximaler Blutaufnahme, liegt die Übertragungsrate für *B. microti* von Zecke auf das Wirtstier bei nahezu 100 % (Homer et al., 2000). Kleinnager gelten als Hauptreservoir für *B. microti* (siehe Kapitel 1.3.4.). Es gibt jedoch auch Berichte, dass Vogelarten wie die Wilsondrossel (*Catharus fuscescens*), die Katzendrossel (*Dumetella carolinensis*), die Walddrossel (*Hylocichla mustelina*), die Wanderdrossel (*Turdus migratorius*), das Rotkehlchen (*Erithacus rubecula*) und andere Vogelarten potentielle Reservoirwirte sein könnten (Franke et al., 2010; Franke et al., 2011; Hildebrandt et al., 2010).

1.3.3. Klinische Fälle, Klinik, Diagnose, Verbreitung

Die humane Babesiose wird in den USA vor allem durch *B. microti* verursacht und kommt dort häufig vor, hat aber hauptsächlich einen milden, selbstlimitierenden Verlauf (Hunfeld et al., 2008; Yabsley und Shock, 2013). Außerhalb der USA wurden importierte *B. microti* Fälle in Taiwan und Australien beschrieben (Shih et al., 1997; Senanayake et al., 2012). In Europa hingegen gibt es seltener Fälle dieser Erkrankung, die hier vor allem durch *B. divergens*-ähnliche Babesien verursacht werden, jedoch schwerwiegendere Symptome, vor allem bei immunsupprimierten Patienten, verursachen können (Hildebrandt et al., 2013; Mathis et al., 2006). Es gibt nur wenige klinische Berichte von *B. microti*-Infektionen aus europäischen Ländern wie der Schweiz, Polen und der Tschechischen Republik, bei denen die Patienten aber zuvor in den USA waren (Nohýnková et al., 2003; Baumann et al., 2003). Bisher wurde nur ein autochthoner Fall einer *B. microti*-Infektion in Europa beschrieben (Hildebrandt et al., 2007). Der Patient war immunsupprimiert und erkrankte aufgrund einer Transfusion mit Babesien-infiziertem Blut. Es gibt ein sehr weitreichendes Spektrum an unterschiedlichen Symptomen, die unter anderem als Malaria-ähnlich beschrieben werden können. Mögliche Symptome sind Abgeschlagenheit, Fieber, Übelkeit, Schüttelfrost, Anämie, Gewichtsverlust und Hämaturie, was jedoch erst bei einer sehr hohen Parasitämie sichtbar wird (Hildebrandt et al., 2013). Eine gesicherte Diagnose erfolgt mittels Giemsa-angefärbten Blutaussstrichen, in denen *B. microti* Trophozoiten in infizierten Erythrozyten sichtbar sind (Vannier und Krause, 2012). Die Malteser-Kreuz-förmige Anordnung von vier Trophozoiten in einem Erythrozyten ist pathognomonisch für *B. microti* und *B. ducani*. Der sensitivste *B. microti* Nachweis erfolgt jedoch mittels PCR. Eine serologische Diagnose erfolgt mittels indirektem Immunfluoreszenz-Antikörper Nachweis, wobei hierbei keine Aussage über den Zeitpunkt

der Infektion getroffen werden kann (Hunfeld et al., 2002). Ist durch den klinischen Vorbericht eine Babesiose stark indiziert, jedoch durch die bisher genannten diagnostischen Mittel nicht nachweisbar, kann dem Patienten Blut entnommen werden, was in Versuchstiere, wie Hamster, inokuliert wird. Innerhalb von zwei bis vier Wochen ist *B. microti* im Blut des Versuchstiers nachweisbar (Krause et al., 1996). In Tabelle 3 wird die Verbreitung von *B. microti* in *I. ricinus* Zecken in Europa veranschaulicht.

Tabelle 3 Vorkommen von *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* Zecken von unterschiedlichen Habitaten und Tieren in Europa (Auszug)

Land	Art des Habitats	Anzahl positiver / untersuchter Zecken	Prävalenz (%)	Referenz
Deutschland	unterschiedliche Habitats	3/3113	0,1	Hartelt et al., 2004
	silvatisch	11/625	1,8	Overzier et al., 2013b
Ungarn	urban und silvatisch	4/452	0,9	Sréter et al., 2005
	periurban und silvatisch	4/112 Pools	3,6	Kálmán et al., 2003
Belgien	von Katzen und Hunden abgesammelt	3/841	0,4	Lempereur et al., 2011
Polen	silvatisch	9/1513	0,6	Siński et al., 2006
	silvatisch	1/182-35/440	0,5-8,0	Wójcik-Fatla et al., 2006
	periurban und silvatisch	130/2095	6,2	Skotarczak et al., 2002
Niederlande	silvatisch	2/1488	0,1	Wielinga et al., 2009
Tschechien	silvatisch	5/350	1,5	Rudolf et al., 2005
Schweiz	von wildlebenden Kleinnagern abgesammelt	2/465	0,4	Burri et al., 2011
Estland	silvatisch	18/2603	0,7	Katargina et al., 2011
Slowenien	silvatisch	4/135	3,0	Duh et al., 2001
Frankreich	silvatisch	5/1478	0,3	Bonnet et al., 2014

1.3.4. Kleinsäuger als Reservoir

In einer vergangenen Studie aus den USA wurden verschiedene Kleinnager- und Vogelarten auf *B. microti* untersucht. Dabei wurden 14 verschiedene Arten mit Prävalenzen zwischen 0,7

und 29,5 % als potentielle Reservoirwirte beschrieben (Hersh et al., 2012). Die höchste Prävalenz wurde in Weißfußmäusen nachgewiesen. Hohe Prävalenzraten konnten auch in anderen Nagerarten detektiert werden, z. B. in der Nördlichen Kurzschwanzspitzmaus (*Blarina brevicauda*), dem Nord- oder Virginia-Opossum (*Didelphis virginiana*), dem Südlichen Gleithörnchen (*Glaucomys volans*), dem Streifenskunk (*Mephitis mephitis*), dem Waschbär (*Procyon lotor*), dem Grauhörnchen (*Sciurus carolinensis*), der Amerikanischen Masken-Rotzahnspitzmaus (*Sorex cinereus*), dem Streifen-Backenhörnchen (*Tamias striatus*) und dem Gemeinen Rothörnchen (*Tamiasciurus hudsonicus*). Auch die Wiesenwühlmaus (*M. pennsylvanicus*) wurde als potentielles Reservoir beschrieben (Anderson et al., 1986). In Europa wurde *B. microti* bereits in verschiedenen Mäusearten wie der Rötelmaus [(*My. glareolus*; 6-15,9 %) Beck et al., 2011; Duh et al., 2003; Tadin et al., 2012], der Waldspitzmaus [(*Sorex araneus*; 30,3 %) Bown et al., 2011], der Erdmaus [(*M. agrestis*; 30,4 %) Bown et al., 2011], der Feldmaus [(*M. arvalis*; 9-27,2 %) Yabsley und Shock, 2013; Bown et al., 2008], der Sumpfmaus (*M. oeconomus*) (Siński et al., 2006) und in der Gelbhalsmaus [(*Apodemus flavicollis*; 11,8-16,2 %) Beck et al., 2011; Duh et al., 2003; Siński et al., 2006; Tadin et al., 2012] nachgewiesen.

2. Kleinsäuger

2.1. Taxonomie

Kleinsäuger gehören systematisch zum Reich der Animalia und der Klasse Mammalia. Während Wühlmäuse und Langschwanzmäuse der Ordnung der Rodentia, also der Nager, angehören, gehören die Spitzmäuse zur Ordnung der Soricomorpha und zur Familie der Soricidae. Kleinsäuger nehmen die Reservoirfunktion von vielen zoonotischen bakteriellen, parasitären und viralen Krankheitserregern ein. Daneben haben sie eine wichtige Funktion in der Entwicklung von subadulten Zeckenstadien. So parasitieren beispielsweise *I. trianguliceps* Zecken (Mauszecke) fast ausschließlich auf Kleinsäufern (auch adulte Stadien) (Deplazes et al., 2012) und auch subadulte Stadien von *D. reticulatus* Zecken sind vornehmlich auf Rötelmäusen, jedoch auch auf anderen Kleinnagerarten wie Gelbhalsmäusen zu finden (Paziewska et al., 2010; Kiffner et al., 2011). Auch subadulte Zeckenstadien von *I. ricinus* parasitieren auf Kleinnagern, wobei die Befallsrate auf Langschwanzmäusen im Allgemeinen höher ausfällt als auf Rötelmäusen, die kleiner sind. Dafür gibt es zwei Gründe: Zum einen korreliert die Befallsrate positiv mit der Körpergröße und zum anderen haben Rötelmäuse eine Resistenz gegen den Befall dieser Zeckenspezies gebildet (Dizij und Kurtenbach, 1995; Randolph, 2004). Im folgenden Abschnitt werden die potentielle

Reservoirfunktion sowie der Lebensraum der jeweiligen für diese Arbeit relevanten Mäusespezies näher erläutert.

2.2. Vorkommen, Lebensraum, Reservoirfunktion

2.2.1. Echte Mäuse, Langschwanzmäuse (Muridae)

2.2.1.1. Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*)

In westlichen Teilen Europas ist die Waldmaus (*Ap. sylvaticus*) heimisch. Sie besiedelt Habitats im Flachland, ist aber auch im Mittelgebirge endemisch. Durch ihre starke morphologische Ähnlichkeit zur Gelbhalsmaus wurde sie erst spät als eigenständige Spezies anerkannt und konnte taxonomisch von der Gelbhalsmaus abgegrenzt werden. Die Waldmaus bevorzugt Habitats im Offenland und agrarisch geprägte Gebiete wie Waldränder, Feldraine und Brachflächen. Somit ist ihr Name teilweise missverständlich, da die Waldmaus vornehmlich nicht in Wäldern anzutreffen ist (Hauer et al., 2009), da sie dort durch die konkurrenzstärkere, größere Gelbhalsmaus verdrängt wird. In Deutschland bewohnt die Waldmaus auch urbane Gebiete, wie Gärten und Parks, wo sie sich im Winter in Gebäude und Scheunen zurückzieht. *Apodemus sylvaticus* gilt unter anderem als Reservoir für das Frühsommermeningoencephalitis-Virus (FSME-V), *Borrelia burgdorferi* sensu stricto und *Francisella tularensis* (Achazi et al., 2010; Christova und Gladnishka, 2005).

2.2.1.2. Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*)

Der Lebensraum der Gelbhalsmaus erstreckt sich über ganz Mittel- und Osteuropa. Morphologisch ist sie schwer von der Waldmaus zu unterscheiden (Hauer et al., 2009). Die Gelbhalsmaus ist in allen Waldarten anzutreffen, wobei sie jedoch unterholzreiche Laubschichten und Mischwälder mit alten Baumbeständen und geringer Krautschicht bevorzugt (Hauer et al., 2009). Durch ihre Größe und ihre guten Kletterfähigkeiten ist die Gelbhalsmaus der Waldmaus wie auch der Rötelmaus körperlich überlegen und besiedelt so höhere Waldschichten, wie Hecken und Bäume. Auf landwirtschaftlich genutzten Flächen siedelt sich die Gelbhalsmaus im Saum- und Feldgehölze an und meidet offene vegetationslose Flächen wie auch Feuchtstandorte. Im Winter ist es möglich, dass sie sich ein Quartier in Gebäuden sucht. Unter anderem dient *Ap. flavicollis* als Reservoir für *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* s. s., *Borrelia garinii*, *Leptospira* spp., *Francisella tularensis*, das Kuhpocken-Virus (CPXV), das FSME-V, das Dobrava-Belgrad Virus (DOBV) und das Hepatitis-E Virus (Kaysser et al., 2008; Klempa et al., 2003; Laakkonen et al., 2006; Meerburg et al., 2009; Richter et al., 1999; Turk et al., 2003). Diskutiert wird *Ap. flavicollis*

auch als Reservoir für CNM oder *B. microti* (Beck et al., 2011; Jahfari et al., 2012;).

2.2.1.3. Brandmaus (*Apodemus agrarius*)

Die Brandmaus kommt vor allem im Osten Europas vor. In Deutschland ist sie im Nordosten endemisch. Sie bevorzugt feuchte Habitate (Dolch, 1995), besiedelt jedoch auch Parkanlagen und Gärten. Wälder meidet die Brandmaus (Hauer et al., 2009). *Apodemus agrarius* spielt als Reservoirwirt für *Borrelia burgdorferi* s. s., *Leptospira* spp., *F. tularensis* und für *A. phagocytophilum* eine Rolle (Cao et al., 2006; Cho et al., 1998; Lee et al., 2002; Zhan et al., 2009).

2.2.2. Wühlmäuse (Cricetidae)

2.2.2.1. Rötelmaus (*Myodes glareolus*)

Die Rötelmaus ist eine der am weitesten verbreiteten Mäusearten Europas. Die Verbreitung erstreckt sich über den nördlichen Polarkreis bis zu den Pyrenäen und von Osten nach Westen über die europäische Atlantikküste bis zum Ural. Die Rötelmaus siedelt sich in vielen unterschiedlich strukturierten Habitaten an. So ist sie auf landwirtschaftlichen Flächen wie Äckern zu finden, jedoch auch in Parks, Industrie- und Neubaugebieten. Für die Verbreitung in Parks im Stadtinnern benötigt sie jedoch Korridore, gebildet durch Hecken oder Büsche, die ihr die Zuwanderung erleichtern (Hauer et al., 2009). Im natürlichen Raum besiedelt die Rötelmaus Uferbereiche genauso wie Wälder, Nasswiesen und trockene Weiden. Auch wenn die Rötelmaus primär in Waldgebieten zu finden ist, kann sie sich gut an neu entwickelte Lebensbedingungen anpassen. So findet man sie auch in neu entstandenen natürlichen Lebensräumen, die in Folge von Renaturierungsarbeiten von Bergbaulandschaften entstanden sind (Hauer et al., 2009). Die Rötelmaus dient als Reservoir für das Puumala Virus, FSME-V, CPXV und das Ljunganvirus (Hauffe et al., 2010; Essbauer et al., 2010; Labuda et al., 1997; Olsson et al., 2005). Bakterielle Erreger wie *Borrelia burgdorferi* s. s., *Borrelia afzelii*, *Leptospira* spp., *A. phagocytophilum*, CNM und *F. tularensis* können ebenfalls von dieser Mäuseart beherbergt werden (Bown et al., 2003; Buffet et al., 2012; Kaysser et al., 2008; Silaghi et al., 2012b; c; Tadin et al., 2012). Es wird ebenfalls eine mögliche Reservoirfunktion für *B. microti* beschrieben (Nefedova et al., 2013).

2.2.2.2. Feldmaus, Erdmaus (*Microtus* spp.)

Die Erdmaus (*M. agrestis*) ist vor allem im westlichen und nördlichem Europa verbreitet und ist auch in Teilen Asiens endemisch. Ihr Lebensraum ist durch dichte Krautschichten und feuchte Böden geprägt (Hauer et al., 2009). Die Feldmaus (*M. arvalis*) ist der Erdmaus

morphologisch sehr ähnlich. Die Verbreitung beider Arten in Europa gleicht sich, jedoch ist die Feldmaus im Norden Europas nicht endemisch. Beide Arten bevorzugen offene Landarten mit kurzem Rasen. Auch auf grünen Nutzflächen, Äckern und Felddrainen sind beide Arten zu finden, jedoch nicht in Wäldern und Gebieten mit zunehmender Bewuchsdichte (Hauer et al., 2009). Die Erdmaus ist im Gegensatz zur Feldmaus vor allem an Felddrainen mit hoher Bodenfeuchte vorzufinden. Die Feldmaus wird für viele virale wie auch bakterielle Erreger als Reservoir bzw. Vektor angesehen, wie z.B. für FSME-V, CPXV und das Ljunganvirus (Achazi et al., 2010; Essbauer et al., 2010; Salisbury et al., 2014). Bakterielle Erreger wie *Leptospira* spp., *Coxiella burnetti*, *Borrelia afzelii*, *F. tularensis* und *Brucella microti* können ebenfalls von Feldmäusen beherbergt werden (Smetanova et al., 2006; Scholz et al., 2008; Kaysser et al., 2008; Kuiken et al., 1991). Diskutiert wird eine Reservoirfunktion für *B. microti* und *A. phagocytophilum* (Bown et al., 2003; 2008). Außerdem ist es möglich, dass Feldmäuse CNM beherbergen (Krücken et al., 2013).

2.2.3. Spitzmäuse (Soricidae)

2.2.3.1. Rotzahnspitzmäuse (*Sorex* spp.)

Die Waldspitzmaus (*S. araneus*) ist die in Deutschland am weitesten verbreitete Spitzmausart (Hauer et al., 2009). Man findet sie in Zentraleuropa, jedoch ist sie auch in Großbritannien und in Regionen nahe den Pyrenäen verbreitet. Die Schabrackenspitzmaus (*S. coronatus*) gehört ebenso wie die Waldspitzmaus zur Gattung der Rotzahnspitzmäuse. Durch ihre identischen Lebensraumanforderungen sind beide Mäusearten selten im selben Habitat anzutreffen. Beide Arten besiedeln viele unterschiedlich strukturierte Lebensräume und Höhenlagen (Hauer et al., 2009). Man findet sie z. B. in Sumpfbereichen, Uferbereichen von Bächen aber auch auf Grasweiden, in Parks und in Wäldern (Hauer et al., 2009). Die Waldspitzmaus stellt ein mögliches Reservoir für *B. microti* und *A. phagocytophilum* dar (Bown et al., 2003; 2008).

3. Zecken

3.1. Taxonomie

Taxonomisch gehören die Zecken dem Unterstamm der Amandibulata, der Klasse der Arachniden und der Unterklasse der Acari an. Die Ordnung der Metastigmata, der ca. 860 Arten angehören, teilt sich in 3 Familien (Nuttalliellidae, Schildzecken (Ixodidae), Lederzecken (Argasidae)). Die Familie der Schildzecken teilt sich wiederum in 5 Unterfamilien (Ixodinae, Hyalomminae, Amblyomminae, Haemaphysalinae und

Rhipicephalinae) (Deplazes et al., 2012). Die jeweiligen Unterfamilien lassen sich nach ihrer Wirtsfindungsstrategie in „Wegelagerer“ (Rhipicephalinae, Ixodinae, Haemaphysalinae) und in „Jäger“ (Amblyomminae, Hyalomminae) unterteilen. Das folgende Kapitel behandelt die für diese Arbeit relevanten Zecken-Arten.

3.2. Entwicklungszyklus von *Ixodes ricinus*, *Ixodes trianguliceps* und *Dermacentor reticulatus*

Ixodes spp. wie auch *D. reticulatus* Zecken haben einen dreiwirtigen Lebenszyklus. Sie haben insgesamt vier unterschiedliche Entwicklungsstadien: Ei, Larve, Nymphe und Adulte (Weibchen bzw. Männchen). Zur Vollendung ihres Entwicklungszyklus saugen sie an drei unterschiedlichen Wirten Blut, wobei das erste parasitierende Stadium die Larve ist (Randolph, 2004; Sonenshine, 1991). Die Zecken der Unterfamilien Rhipicephalinae und Ixodinae zählen zu den sogenannten „Wegelagerern“ (Deplazes et al., 2012). Im Gegensatz zu den „Jägern“, die gezielt nach einem Wirt suchen, ist das typische Verhalten für „Wegelagerer“, dass sie beispielsweise an erhöhten Grashalmen an Waldrändern, Lagerplätzen von Wildtieren oder Laufkorridoren warten, bis sich ein geeigneter Wirt nähert. Der Befall des Wirtes lässt sich in vier Phasen unterteilen. Dabei wird in der ersten Phase die Zecke durch günstige Witterungsbedingungen wie Windstille, geeignete Temperatur und Luftfeuchte, die je nach Art variieren, aktiviert. In der zweiten Phase kommt es zum Appetenzverhalten der Zecke. Die Ortung des Wirtes erfolgt dabei über das Hallersche Organ am ersten Beinpaar. Hat die Zecke Kontakt mit dem Wirt aufgenommen, lässt sie sich von diesem von der Vegetation abstreifen. In der dritten Phase sucht die Zecke mit Hilfe von Sensillen an ihren Cheliceren eine geeignete Hautpartie für die Blutaufnahme auf dem Wirt. Prädisponiert für einen Zeckenbiss sind Stellen mit dünner, gut durchbluteter Haut wie z.B. Achselhöhlen, Kniekehlen oder der Haaransatz, wo die Zecke letztendlich ansetzt, was die vierte Phase des Wirtbefalls einleitet. Dabei durchdringt die Zecke mit den Cheliceren die Haut und verankert sich dort mit dem Hypostom (Lucius und Loos-Frank, 2008). Der Saugakt bei *I. ricinus* Zecken dauert je nach Entwicklungsstadium in der Regel 2-10 Tage, kann jedoch auch 2-3 Wochen andauern (Deplazes et al., 2012). Bei *I. trianguliceps* Zecken dauert der Saugakt in der Regel zwischen 5 und 17 Tage (Randolph, 1975). *Dermacentor reticulatus* saugen zwischen 7 und 14 Tage an ihrem Wirt, wobei dies zusätzlich von den Witterungsbedingungen abhängig ist (Honzakova, 1971). Blutgerinnung sowie Entzündungs- und Immunreaktionen des Wirtes, die den Saugakt der Zecke behindern könnten, werden durch verschiedene Stoffe im Zeckenspeichel unterbunden. Nach Vollendung des Saugaktes löst sich die Zecke und häutet sich auf dem Boden zum nächsten Entwicklungsstadium. Auch

die Eiablage des Weibchens erfolgt auf dem Boden, wohingegen die Befruchtung der Weibchen auf dem Wirt erfolgt. Je größer die Menge an gesaugtem Blut, desto mehr Eier kann das Weibchen legen. Im Gegensatz dazu, nehmen *Ixodes* Männchen kein oder nur eine sehr geringe Menge an Blut auf (Deplazes et al., 2012; Lucius und Loos-Frank, 2008; Sonenshine, 1991). Bei *D. reticulatus* Zecken saugen Männchen und Weibchen Blut (Immler et al., 1973). Die Entwicklung einer Generation von *I. trianguliceps* bzw. *D. reticulatus* dauert weniger als ein Jahr bzw. 1-1,5 Jahre (Gingrich, 2001; Heile et al., 2006). Die Entwicklung einer Generation von *I. ricinus* Zecken dauert hingegen durchschnittlich 2-3 Jahre, bis hin zu 5-6 Jahren (Sonenshine, 1991; 1993). Dies liegt u. a. daran, dass das Einsetzen der Häutung vom Nymphenstadium zur adulten *I. ricinus* Zecke bis zu 100 Tage dauern kann. Im Vergleich dazu dauert die Häutung der Nymphen bei *I. trianguliceps* und *D. reticulatus* nur wenige Tage. Die Übertragung von Krankheitserregern kann innerhalb einer Zeckenpopulation auf verschiedene Weise geschehen. So kann eine Übertragung transovariell vom adulten Zeckenweibchen auf die nächste Zeckengeneration erfolgen. Eine Infektion kann während der Häutung auch von einem Zeckenstadium auf das folgende bestehen bleiben (transstadiale Übertragung). Eine horizontale Übertragung kann bei der Befruchtung von der männlichen Zecke auf das Weibchen erfolgen (sexuelle Übertragung). Außerdem kann es zum sogenannten „Co-Feeding“ kommen, wenn eine infizierte Zecke am gleichen Wirt saugt wie eine nicht infizierte, wobei diese über das Blut des Wirtes, der nicht unbedingt infiziert sein muss, infiziert wird (Deplazes et al., 2012). Drei Zeckenarten (*I. ricinus*, *I. trianguliceps*, *D. reticulatus*), die für diese Arbeit relevant sind, werden im folgenden Kapitel näher betrachtet.

3.3. Vorkommen, Verbreitung, Reservoirwirte, Vektorfunktion

3.3.1. Ixodidae

3.3.1.1. Gemeiner Holzbock (*Ixodes ricinus*)

Ixodes ricinus ist die bedeutendste *Ixodes*-Art in Mitteleuropa, die am häufigsten an der Übertragung von Zecken-übertragenen Pathogenen beteiligt ist (Gern, 2005) und vor allem in Habitaten mit hoher relativer Luftfeuchtigkeit (>75 %) und dauerhafter Beschattung vorkommt (Lucius und Loos-Frank, 2008). Bei *I. ricinus* weist jedes Entwicklungsstadium im Regelfall eine bimodale Aktivität (Mai-Juli und September-November) auf, wobei sich die Aktivitätszeiten der jeweiligen Entwicklungsstadien überschneiden können. Das Vorkommen von *I. ricinus* erstreckt sich von Süd nach Nord über Nordafrika bis nach Skandinavien und von Ost nach West über das Kaspische Meer bis nach Portugal. In wärmeren Gebieten

Südeuropas und Nordafrikas weicht diese Zeckenspezies auf die klimatisch milderen Höhenlagen aus (bis zu 2000 m) (Deplazes et al., 2012; Lucius und Loos-Frank, 2008).

Die Entwicklungsstadien von *I. ricinus* Zecken können insgesamt auf etwa 200 Wirbeltierarten vorkommen, bevorzugen aber unterschiedliche Wirte (Deplazes et al., 2012). So saugen Larven vornehmlich auf Kleinsäugetern, besonders auf Arten der Familien Muridae, Soricidae und Microtidae, aber auch auf Vögeln und größeren Säugern. Nymphen hingegen parasitieren, durch ihren größeren Aktionsraum im Vergleich zu Larven, auch auf Reptilien, Großtieren und Menschen. Adulte Stadien finden sich häufig auf Schafen, Rindern, Großwild aber auch auf Menschen, Füchsen und Mardern. *Ixodes ricinus* besitzt eine Vektorfunktion für Protozoen wie *Babesia divergens*, *Babesia capreoli*, *Babesia venatorum* und wahrscheinlich auch *B. microti* (Heyman et al., 2010). Aber auch für bakterielle Erreger wie *A. phagocytophilum* (Heyman et al., 2010; Rikihisa, 1991), *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia monacensis* (Socolovschi et al., 2009) und *Borrelia burgdorferi* sensu lato gelten *I. ricinus* Zecken als Vektor (Fingerle et al., 1999). Viren, wie das FSME-Virus (Charrel et al., 2004) aber auch das Louping-III-Virus können von dieser Zeckenart übertragen werden (Laurenson et al., 2003).

3.3.1.2. Mauszecke (*Ixodes trianguliceps*)

Ixodes trianguliceps kommt in weiten Teilen Mitteleuropas vor. Diese Art ist vom nördlichen Teil Spaniens bis nach Schweden endemisch. Von Ost nach West findet man diese Zeckenart von Russland bis nach Frankreich. *Ixodes trianguliceps* ist eine Zeckenspezies die, im Gegensatz zu *I. ricinus*, eine eher endophile Lebensweise aufzeigt. Das bedeutet, dass sie vor allem in Nestern und Tierbauten, und weniger auf der offenen Vegetation vorkommt (Bown et al., 2008; Welc-Falęciak et al., 2008). Diese Zeckenart befällt deshalb nur selten den Menschen. Vor allem subadulte, aber auch adulte Entwicklungsstadien parasitieren auf Kleinsäugetern wie *Myodes* spp., *Arvicola* spp., *Apodemus* spp., *Microtus* spp. und *Sorex* spp. (Deplazes et al., 2012; Gingrich, 2001). *Ixodes trianguliceps* überträgt vermutlich *A. phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato und *B. microti* (Bown et al., 2003; 2008; Kovalevskii et al., 2013).

3.3.2. Rhipicephalinae

3.3.2.1. Auwaldzecke (*Dermacentor reticulatus*)

Bis 1950 wurde *D. reticulatus* in Deutschland noch nicht als endemisch beschrieben (Heile et al., 2006). Diese Zeckenart bevorzugt wärmere, feuchte Habitate mit dichter Krautschicht, gilt

als kältetolerant und hat wie *I. ricinus* eine bimodale Aktivität, die sich jedoch bei den einzelnen Entwicklungsstadien nicht überschneidet, im Gegensatz zu *I. ricinus* Zecken. Es wird angenommen, dass *D. reticulatus* vor allem an Standorten mit hohen Bodenfeuchten und regelmäßigen Überschwemmungen anzutreffen ist. Jedoch wurde diese Zeckenspezies auch an weitaus untypischeren Standorten, wie Weideflächen und trockenen Nadelwäldern vorgefunden (Bauch und Danner, 1988; Zygner et al., 2009). Dabei sind diese Zecken in Deutschland nicht über größere zusammenhängende Areale verbreitet, sondern treten eher in kleinen abgrenzbaren Gebieten fokal auf. Insgesamt erstreckt sich das Verbreitungsgebiet dieser Zecke von Spanien bis in die nördlichsten Teile Deutschlands und von Frankreich bis nach Zentralasien. Subadulte Zeckenstadien wie Larven und Nymphen befallen vor allem Kleinsäuger wie Igel, Feld- und Waldmäuse, seltener auch Vögel (Cerny et al., 1972; Heile et al., 2006). Adulte parasitieren auch auf großen Wild- und Haustieren, wie z.B. Hunden, Schafen, Rehwild, Rindern und Pferden (Bauch und Danner, 1988; Hornok et al., 2007; 2012; 2013). Selten befällt diese Zeckenart auch den Menschen. *Dermacentor reticulatus* dient als Vektor für folgende Protozoen: *Babesia canis canis*, *Babesia caballi* und *Theileria equi*. Auch bakterielle Erreger wie *F. tularensis*, *R. raoultii* und *R. slovaca* können von dieser Zeckenart übertragen werden (Hubalek et al., 1996; Jongejan und Uilenberg, 2004; Matsumoto et al., 2009; Zygner et al., 2008). Die Vektorfunktion für CNM und *A. phagocytophilum* scheint aufgrund von sehr geringen Prävalenzen in Vorgängerstudien zweifelhaft (de la Fuente et al., 2008; Krücken et al., 2013), wird jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen (Silaghi et al., 2012c; Karbowski et al., 2014).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Standorte

Untersuchungen an drei unterschiedlich strukturierten Habitaten waren Teil dieser Studie. Zwei dieser Gebiete wurden im Rahmen des EU-Projekts EDENext (<http://www.edenext.eu/>) unter projektspezifischen Gesichtspunkten bereits in einer vorhergehenden Studie ausgewählt (Overzier et al., 2013b). Ziel dieser ersten Studie war es Prävalenzen von Pathogenen in Zecken an unterschiedlich strukturierten Habitaten miteinander vergleichen zu können. So wurde in den Leitlinien des Projekts festgelegt, dass ein urbaner Standort beprobt werden sollte, in dem der Kontakt zwischen Haus- und Wildtieren gegeben ist. Im Gegensatz dazu sollte ein Waldstandort untersucht werden, in dem nahezu keine Interaktion zwischen Wild- und Haustieren erfolgt. Beide dieser zuvor ausgewählten Standorte (R1, T) liegen in Bayern und sind Teil der vorangegangenen Studie, für die wirtssuchende Zecken untersucht wurden (Overzier et al., 2013a). In der gegenwärtigen Studie, die ebenfalls teilweise Bestandteil des EU-Projekts EDENext ist, wurden an beiden Standorten Kleinsäuger gefangen und zusätzlich an einem der beiden Standorte wirtssuchende Zecken gesammelt. Die Standortauswahl wurde für diese Studie um ein weiteres Gebiet (S) erweitert, das sich durch seine Lage und Beschaffenheit zu den zuvor gewählten Standorten unterscheidet. Dieser Standort liegt in Sachsen und ist Teil eines kürzlich renaturierten Braunkohleabbaugebiets. Der Kontakt zwischen Haus- und Wildtieren ist dort möglich. An diesem Standort wurden ebenfalls Kleinsäuger gefangen. Nähere Beschreibungen zu den Standorten sind in diesem Kapitel zusammengestellt.

1.1. Urbaner Standort „Dörnbergpark“ R1 (Regensburg, Oberpfalz)

Beim Dörnbergpark handelt es sich um eine kleine Grünanlage (7,4 ha, 49°00'55.72''N, 12°05'08.89''E), die westlich vom Stadtkern Regensburgs liegt. Von einer vielbefahrenen Straße und von Mauern umgeben, bietet der Park ein in sich nahezu abgeschlossenes ökologisches System. Das Betreten von Wiesenflächen ist für die zahlreichen Besucher und ihre an der Leine zu führenden Hunde gestattet. Der Park zeichnet sich durch eine hohe Artenvielfalt an Pflanzen und Vögeln aus. Kleinsäuger wie Igel und Eichhörnchen sind in diesem Park im Gegensatz zu Großwild gegenwärtig (Stadt Regensburg Umweltreferat-Gartenamt, 1996). Dieser Standort liegt auf einer Höhe von 343,0 m über Normalhöhennull (ü. NHN), hat eine jährliche Niederschlagsmenge von 583,9 mm und ist in Abbildung 1 dargestellt.



Abb. 1 Dörnbergpark

1.2. Silvatischer Standort „Angelberger Forst“ T (Tussenhausen, Unterallgäu)

Der im Unterallgäu gelegene Waldstandort umfasst 640,8 ha (48°06'36.42''N, 10°34'33.40''E) und ist damit fast 90-mal so groß wie der zuvor beschriebene Park. Neben seiner Größe unterscheidet sich der Waldstandort vom Stadtpark dadurch, dass es hier ein großes Vorkommen an unterschiedlichen Kleinsäuger- und Großsäugerarten, wie Spitzmäusen, Rötelmäusen aber auch Wildschweinen und Rehwild, gibt. Da der Wald einem Naturschutzgebiet angehört, ist es für die wenigen Besucher, die den Wald frequentieren,

nicht gestattet sich außerhalb der gekennzeichneten Wege aufzuhalten. Somit gibt es nur einen geringen anthropogenen Einfluss und kaum Interaktion zwischen Wild- und mitgeführten Haustieren (Forstdirektion Oberbayern-Schwaben: Managementplan zum FFH-Gebiet 7829-301 "Angelberger Forst", 2004). Des Weiteren liegt der Waldstandort auf 575,0 m ü. NHN, hat eine jährliche Niederschlagsmenge von 788,8 mm und ist in Abbildung 2 dargestellt.



Abb. 2 Angelberger Forst

1.3. Renaturierter Standort „Cospudener See“ S (Landkreis Leipzig)

Der in Sachsen gelegene Cospudener See wird von folgenden Städten umgrenzt: Markkleeberg, Leipzig und Lindenau. Die Landschaftsflächen, die den See umgeben gehören einem ehemaligem Braunkohleabbaugebiet an und wurden im Verlauf der letzten Jahrzehnte renaturiert. Durch die große Fläche (436,0 ha) des Sees wurden das untersuchte Areal in drei angrenzende Gebiete unterteilt ($51^{\circ}15'32.2''N$, $12^{\circ}21'02.5''E$; $51^{\circ}17'01.3''N$, $12^{\circ}21'00.6''E$; $51^{\circ}26'97.2''N$, $12^{\circ}32'25.6''E$), die jeweils an der West-, Ost-, und Nordseite des Sees liegen. An diesem Standort gibt es ein unterschiedliches Vorkommen von Wildtieren, aber auch starken anthropogenen Einfluss, da der See und seine Umgebung eine große Vielfalt an Freizeitaktivitäten bieten und somit als eines der wichtigsten Naherholungsgebiete Leipzigs gelten (www.leipzigerneuseenland.de). Der renaturierte Standort hat eine niedrige Höhenlage und die geringste Niederschlagsmenge (138,0 m ü.

NHN; 531,0 mm). Abbildung 3 zeigt den Cospudener See.



Abb. 3 Cospudener See

2. Probensammlung, Feldarbeit

2.1. Kleinsäuger

Kleinsäuger wurden an beiden bayrischen Standorten in den Zeiträumen Juli bis Oktober 2012 und April bis September 2013 mittels für Kleinsäuger geeigneter Lebendfallen (H.B. Sherman Traps, Inc., Tallahassee, Fla., U.S.A.) gefangen. Mäuse vom sächsischen Standort, die zwischen März und Oktober 2012 sowie Januar und September 2013 gefangen wurden, standen für diese Studie ebenfalls zur Verfügung (Offizielle Fang-Genehmigungen: Standort S: AZ 36.11-36.45.12/4/12-001, Standort R1: 55.1-8646.4-140, Standort T: 55.1-8646-2/30). Es wurden jeweils 50 Fallen an den bayerischen Standorten und 60 Fallen am sächsischen Standort monatlich über drei aufeinanderfolgende Tage aufgestellt. Die Fallen wurden zuvor mit Apfelstücken und Heu als Isoliermaterial bestückt und zweimal täglich in 12 Stunden Abständen kontrolliert. Gefangene Mäuse wurden anhand morphologischer Merkmale überprüft, ob sie geschützten Arten angehörten. War dies der Fall, wurden diese unverzüglich wieder in der Natur ausgesetzt. Andernfalls wurden die Mäuse umgehend mit CO₂ betäubt und anschließend wurde ihnen mittels Herzpunktion jeweils mindestens 0,5 ml Blut entnommen. Daraufhin erfolgte die Tötung der Mäuse durch Genickbruch. Sie wurden bei -80 °C bis zur weiteren Untersuchung aufbewahrt. Das entnommene Blut wurde bis zur

Weiterverarbeitung bei 7 °C gekühlt. In Abbildung 4 sind Lebendfallen zusehen.

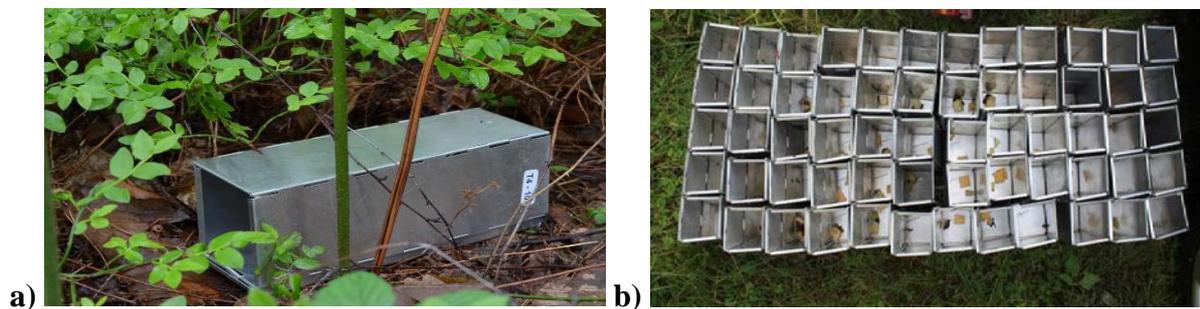


Abb. 4 a) Aufgestellte Lebendfalle (Sherman Trap)

b) Lebendfallen mit Köder

2.2. Auf den Mäusen befindliche Ektoparasiten

Das Fell der Mäuse wurde gründlich mit einem Flohkamm durchkämmt und für Zeckenbefall prädisponierte Stellen visuell abgesucht. Alle auf den Mäusen befindlichen Flöhe, Milben, Läuse und Zecken wurden, soweit makroskopisch zu unterscheiden, in getrennten Röhrchen verwahrt und bis zur weiteren Bestimmung bei -20 °C eingefroren.

2.3. Wirtssuchende Zecken

Wirtssuchende Zecken standen größtenteils aus vorangegangenen Studien zur Verfügung (Auflistung siehe Tabelle 4). Zusätzlich wurden im Jahr 2013 am Waldstandort T mittels der Flagge-Methode zeitgleich zum Mäusefang monatlich von April bis Juni Zecken geflaggt. Dabei wurde ein 1 m² großes Baumwolltuch an einem Holzstock befestigt und über die Vegetation gezogen. Um die saisonale Zecken-Aktivität zu bestimmen, wurde wie in den Bestimmungen des EU-Projekts EDENext vorgegeben, die Flagge so lange alle 2,5 m umgedreht, bis umgerechnet eine Fläche von 100 m² beprobt war. Auf der Flagge befindliche Zecken wurden mit einer Pinzette abgesammelt und in einem mit 70 %igem Ethanol gefüllten Röhrchen aufbewahrt. Es wurde angestrebt mindestens 30 Nymphen, 30 weibliche und 30 männliche Zecken pro Monat mittels dieser Methode zu sammeln. Konnte die Zielmenge an Zecken auf der 100 m² großen Fläche nicht erreicht werden, wurde solange fernab der beprobten Fläche weitergeflaggt bis die repräsentative Anzahl von 30 Zecken pro Stadium bzw. Geschlecht erreicht wurde.

Tabelle 4 *Ixodes ricinus* DNA Proben, die aus Vorgängerstudien aus den Jahren 2009 bis 2013 vom Standort R1 bzw. aus den Jahren 2011 and 2012 vom Standort T verfügbar waren

Jahr	Anzahl der <i>Ixodes ricinus</i> DNA Proben pro Entwicklungsstadium bzw. Geschlecht								Anzahl unter-suchter Zecken
	Standort R1				Standort T				
	Weibchen	Männchen	Nymphe	Larve ^d	Weibchen	Männchen	Nymphe	Larve ^d	
2009 ^a	75	83	67	-	-	-	-	-	225
2010 ^a	60	60	60	-	-	-	-	-	180
2011 ^b	120	120	115	-	33	46	120	145	699
2012 ^b	115	120	120	-	109	117	120	80	781
2013 ^c	85	88	88	-	-	-	-	-	321
Gesamt	455	471	450		141	174	300	225	2216

^averfügbar aus Poljak, 2012, ^bverfügbar aus Overzier, 2013, ^cverfügbar aus Gomez Chamorro, 2014, ^dLarven wurden in Pools à 5 Zecken getestet

3. Aufbereitung der Kleinsäuger- und Zeckenproben

3.1. Kleinsäuger

3.1.1. Morphologische Artenbestimmung

Die morphologische Bestimmung der Mäuse erfolgte größtenteils mittels taxonomischer Schlüssel (Stresemann, 1989). Jedoch wurden 68 zufällig ausgewählte Mäuse mittels konventioneller PCR und anschließender Sequenzierung mit dem Zielgen *Cytochrome b* taxonomisch bestimmt (Parson et al., 2000). Die PCR-Methoden, Primer, das Zielgen und das Thermoprofil sind den Tabellen 5, 6 und 7 zu entnehmen. Beifänge, die tot in den Fallen vorgefunden wurden, wie Feld-, Erd- und Spitzmäuse, wurden aufgrund ihrer Seltenheit alle molekularbiologisch bestimmt.

Tabelle 5 Verwendete Primer zur Ermittlung von Pathogen-DNA bzw. zur Bestimmung von Mäuse- und Zeckenspezies in Mäuse- bzw. Zeckenproben

Untersuchung auf	Primer**	Primersequenz (5'→3')	Ziel-Gen (bp ¹)	Referenz
<i>A. phagocytophilum</i>	ApMsp2f	ATGGAAGGTAGTGTGGTTATGGTATT	<i>msp2</i> (77)	Courtney et al., 2004
	ApMsp2r	TTGGTCTTGAAGCGCTCGTA		
	ApMsp2p*	FAM-TGGTGCCAGGGTTGAGCTTG AGATTG-TMR		
<i>A. phagocytophilum</i>	ge3a	CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC	<i>16S rRNA</i> (497)	Massung et al., 1998
	ge10r	TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC		
	ge9f	AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT		
	ge2	GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG		
<i>Babesia</i> spp.	BJ1	GTCTTGTAATTGGAATGATGG	<i>18S rRNA</i> (411-452)	Casati et al., 2006
	BN2	TAGTTTATGGTTAGGACTACG		
<i>Candidatus Neohrlichia mikurensis</i>	NMikGroE L F2	CCTTGAAAATATAGCAAGATCAGGTA G	<i>groEL</i> (99)	Jahfari et al., 2012; Silaghi et al., 2012b
	NMikGroE L rev1	CCACCACGTAACCTATTTAGCACTAAA G		
	NMikGroE L rev2	CCACCACGTAACCTATTTAGTACTAAA G		
	NMikGroE L-P2a	FAM-CCTCTACTAATTATTGCT GAAGATGTAGAAGGTGAAGC-BHQ1		
Mäuse-Spezies	L14816	CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA	<i>cyt b</i> ² (358)	Parson et al., 2000
	H15173	CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA		
Zecken-Spezies	16S+1	CCGCTGTGAACTCAGATCAAGT	<i>16S rRNA</i> (378-390)	Mangold et al., 1998
	16S-1	GCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG		

*verwendet für DNA extrahiert aus Kleinsäugetern; **bzw. Sonde; ¹bp = Basenpaarlänge; ²cyt b= cytochrome b;

Tabelle 6 Reagenzienmix zur Differenzierung der unterschiedlichen Mäusearten mittels konventioneller PCR

Reagenzien*	µl / Reaktion
Puffer 10x	5,0 µl
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	1,0 µl
Primer L14816 100 µM	0,5 µl
Primer H15173 100 µM	0,5 µl
Molekularbiologisch reines H ₂ O	37,75 µl
Taq Polymerase (5 U/ µl)	0,25 µl
Probe	5,0 µl
Gesamtvolumen	50,0 µl

*HotStar Taq Plus DNA Polymerase Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Tabelle 7 Thermoprofil der PCR zur Differenzierung der unterschiedlichen Mäusearten

PCR Schritt	Zeit	Temperatur	
Initiale Aktivierung	5 min	95 °C	
Denaturierung	30 sek	95 °C	} 45x
Annealing	30 sek	49 °C	
Elongation	40 sek	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	

3.1.2. Blutproben

Die Blutproben wurden bei Zimmertemperatur und 2000 rpm für 6-10 min zentrifugiert, um Serum und zelluläre Bestandteile zu trennen. Insgesamt wurden 200 µl vom Blutpellet zur DNA Extraktion entnommen. Die Blutproben wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

3.1.3. Sektion der Kleinsäuger

Vor der Sektion wurden folgende biometrische Größen der Mäuse erfasst: Länge Kopf-Rumpf, Länge rechtes Ohr, Länge rechte Hintergliedmaße, Länge Kopf-Schwanz, Gewicht. Bei der Sektion wurden folgende Organe entnommen: Herz, Lunge, Milz, Nieren, Enddarm, Gonaden, Harnblase, Gehirn und Haut. Zudem wurde der innere Thorakalbereich, nach Entnahme der Lunge und des Herzens mit jeweils ca. 500 µl PBS gespült. Diese Spülflüssigkeit wurde ebenfalls entnommen. Jedes Organ, bis auf Enddarm und Haut, wurde gewogen und in einem separaten Röhrchen bei -20 °C aufbewahrt. Die Sektion wie auch die Organentnahme sind in Abbildung 5 dargestellt.

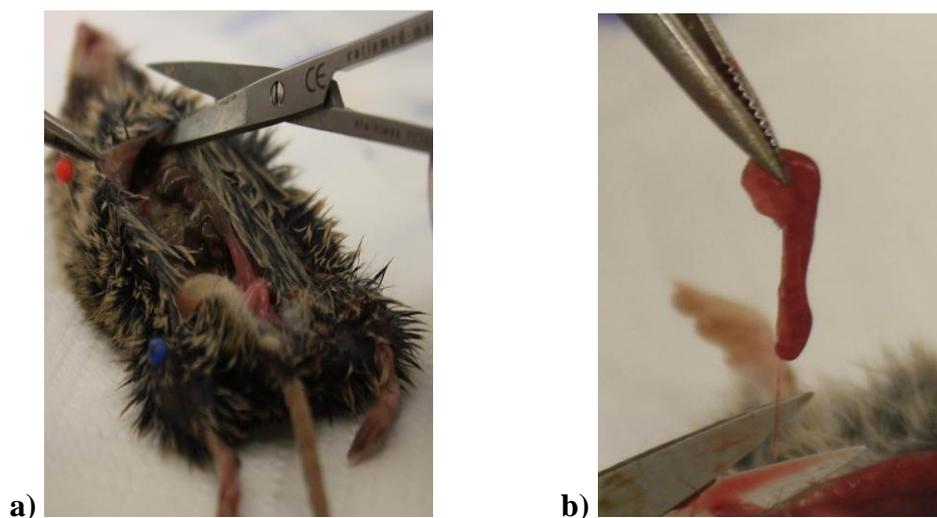


Abb. 5 a) Sektion einer Rötelmaus; b) Entnommene Milz einer Rötelmaus

3.1.4. Aufbereitung von Organproben

3.1.4.1. Milzen

Von den entnommenen Milzen wurden ca. 0,01-0,05 g mit jeweils einer frischen sterilen Skalpellklinge abgeteilt und fein zerkleinert.

3.1.4.2. Gonaden

Die Früchte hochträchtiger Mäuse wurden aus dem Amnionsack befreit, getrennt und je nach Größe der jeweiligen Frucht im Ganzen oder ein abgetrennter Teil der Frucht mit jeweils einer frischen sterilen Skalpellklinge feinzerkleinert und in einem getrennten Röhrchen bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

3.1.4.3. Neonaten

Für die Probengewinnung von neonatalen Mäusemilzen wurden die Neugeborenen sezirt und der obere Bauchhöhleninhalt entnommen. Der entnommene Inhalt wurde ebenfalls mit einem Skalpell fein zerkleinert.

3.2. Aufbereitung von Zecken

3.2.1. Morphologische Bestimmung

Von den Mäusen abgesammelte sowie wirtssuchende Zecken wurden morphologisch nach Spezies, Geschlecht und Entwicklungsstadium anhand taxonomischer Schlüssel (Hillyard, 1996; Siuda, 1991) bestimmt. Wirtssuchende Zecken wurden zuvor in Aq. Dest. gewaschen und getrocknet. Fünf nicht intakte Zecken wurden mittels konventioneller PCR bestimmt (siehe Tabellen 5, 8 und 9) (Mangold et al., 1998).

Tabelle 8 Reagenzienmix zur Differenzierung der unterschiedlichen Zeckenarten mittels konventioneller PCR

Reagenzien*	µl / Reaktion
Puffer 10x	5,0 µl
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	1,0 µl
MgCl ₂ 25mM	2 µl
Primer 16S+1 100 µM	0,5 µl
Primer 16S-1 100 µM	0,5 µl
Molekularbiologisch reines H ₂ O	35,75 µl
HotStar Taq Plus Polymerase (5U/ µl)	0,25 µl
Probe	5,0 µl
Gesamtvolumen	50,0 µl

*HotStar Taq Plus DNA Polymerase Kit (Qiagen)

Tabelle 9 Thermoprofil der PCR zur Differenzierung der unterschiedlichen Zeckenarten

PCR Schritt	Zeit	Temperatur	
Initiale Aktivierung	1 min	94 °C	
Denaturierung	30 sek	95 °C	} 34 x
Annealing	30 sek	47 °C*	
Elongation	35 sek	72 °C	
Finale Elongation	7 min	72 °C	

*6x bei jedem Zyklus um ein halbes Grad steigend bis 50°C erreicht sind dann 28 Zyklen lang wiederholen bei 50°C

3.2.2. Auswahl von Zeckenproben

Von den wirtssuchenden Zecken wurden 30 Zecken pro Spezies, pro Entwicklungsstadium und Geschlecht monatlich zur DNA Extraktion zufällig ausgewählt. Von den auf den Mäusen befindlichen Zecken wurden 5 Zecken pro Entwicklungsstadium und Spezies pro Standort von jeweils mindestens 30 Mäusen pro Spezies, sofern verfügbar, pro Fangmonat für die DNA Extraktion zufällig ausgewählt.

3.2.3. Aufbereitung von Zeckenproben

Vor der DNA-Aufreinigung wurden die Zecken jeweils in ein mit 300,0 µl PBS und einer sterilen Stahlkugel (Durchmesser 5,0 mm) befülltes 2ml Röhrchen verbracht. Mittels des Tissue-Lysers I (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurden die Proben bei 20 Hz für 5 min geschreddert.

Tabelle 10 Übersicht der auf CNM, *A. phagocytophilum* und *B. microti* untersuchten Proben

Verwendetes DNA Material	Untersuchte Pathogene		
	CNM	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>B. microti</i>
Geflaggte Zecken	+	-	-
Gesaugte Zecken	+	+	+
Mäuse Milzen	+	+	+
Mäuse Blut	+	+	+
Mäuse Föten	+*	-	-
Mäuse Neonaten	+*	-	-

*von positiven Muttertieren

4. Molekularbiologische Untersuchungen

4.1. DNA-Extraktion, Messung und Verdünnung

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem „Maxwell 16 System“ (Promega, Mannheim, Deutschland) und dem entsprechenden Extraktionskit „Maxwell 16 LEV Blood DNA Kit“. Zur DNA-Extraktion der Blut-, Organ- und Zeckenproben wurden die bereits wie in Kapitel 3.1.4 und in Kapitel 3.2. beschriebenen, aufbereiteten Proben jeweils mit 300,0 µl Lysis Puffer und 30,0 µl Proteinase K versetzt. Blutproben wurden für mindestens 20 min im Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 56,0 °C und 500,0 rpm inkubiert. Alle weiteren Proben inkubierten über Nacht. Die Proben wurden anschließend automatisiert im „Maxwell 16 System“ extrahiert und daraufhin spektrophotometrisch mit dem NanoDrop®1000 (PiqLab Erlangen, Deutschland) qualitativ wie auch quantitativ hinsichtlich ihres DNA-Gehaltes überprüft. Die gemessenen Proben unterschieden sich im DNA-Gehalt erheblich voneinander (0,7-7599,5 ng/ µl), sodass Proben mit sehr hohen DNA-Konzentrationen mit dem zugehörigen Elutionspuffer in Verdünnungsreihen zu 1:2; 1:3; 1:4; 1:10; 1:20; 1:100; 1:1000; 1:2000 verdünnt wurden, um den DNA-Gehalt der zu untersuchenden Proben anzugleichen. Eine DNA-Konzentration von 5,0-40,0 ng/ µl wurde angestrebt.

4.2. Polymerase-Kettenreaktion

In Tabelle 10 ist dargestellt, welche Zecken- bzw. Mäuseproben auf *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp. und CNM untersucht wurden. Genaue Angaben zu PCR Methoden, Zielgenen, Referenzen und Primern bzw. Sonden sind Tabelle 6 zu entnehmen, wobei anzumerken ist, dass die PCR Methoden für die Detektion von CNM und *A. phagocytophilum* modifiziert

wurden (Schorn et al., 2011a; Silaghi et al., 2011b; Silaghi et al., 2011g; Schorn et al., 2011b). Zur Detektion von CNM in Mäusen und Zecken und von *A. phagocytophilum* in Mäusen, wurde das AB-7500 FAST Real-Time System (Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland) verwendet und zur Detektion von *A. phagocytophilum*-DNA in Zecken wurde das AB 7500 Real-Time-PCR System (Applied Biosystem®) verwendet. Für die Detektion von *A. phagocytophilum* in Zecken wurde der SYBR Green Reaktionsmix und für die Detektion in Kleinsäugetern der Taq-Man Reaktionsmix verwendet. Entsprechende Unterschiede bezüglich Reaktionsmengen und Thermoprofil sind in den Tabellen 13-16 dargestellt. Die nested PCR zum Nachweis von *16S rRNA* für *A. phagocytophilum* wurde bei Proben durchgeführt, die für *A. phagocytophilum* mittels Real-Time PCR einen CT-Wert unter 30,0 erreichten, da in vorangegangenen Studien nachweislich bei Proben mit einem höheren CT-Wert die erzielte PCR Produktmenge von *A. phagocytophilum* zu gering für ein messbares Ergebnis in der nested PCR war (Silaghi et al., 2011g). Jede konventionelle PCR wurde mit dem Eppendorf Mastergradient Cycler (Eppendorf) durchgeführt. Genauere Angaben zu PCR-Methoden, Reaktionsmengen und Thermoprofilen sind den Tabellen 6-9 und 11-20 zu entnehmen. Mäuse- und Zeckenproben, die auf *A. phagocytophilum* und CNM untersucht wurden, wurden bei einem CT-Wert von unter 39,0 als positiv angesehen.

Positive Zeckenproben, die mit dem SYBR Green Mastermix (siehe Tabelle 13) auf *A. phagocytophilum* untersucht wurden, hatten ein Maximum der Schmelzkurve zwischen 76,0 und 79,2 °C.

Tabelle 11 Reagenzienmix zur Detektion von *Babesia* spp. mittels konventioneller PCR

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

*HotStar Taq Plus DNA Polymerase Kit (Qiagen)

Tabelle 12 Thermoprofil der PCR zur Detektion von *Babesia* spp.

PCR Schritt	Zeit	Temperatur	
Initiale Aktivierung	5 min	95 °C	
Denaturierung	30 sek	94 °C	} 40 x
Annealing	30 sek	55 °C	
Elongation	40 sek	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	

Tabelle 13 Reagenzienmix zur Detektion von *A. phagocytophilum* in Zecken mittels Real-Time PCR

Reagenzien*	µl / Reaktion
SYBR®-Green PCR Master Mix (2x)	25,0 µl
Primer ApMsp2f (10 µM)	1,5 µl
Primer ApMsp2r (10 µM)	1,5 µl
Molekularbiologisch reines H ₂ O	17,0 µl
Probe	5,0 µl
Gesamtvolumen	50,0 µl

*SYBR® Green PCR Master Mix 2x, inkl. AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystems®)

Tabelle 14 Thermoprofil der PCR zur Detektion von *A. phagocytophilum* in Zecken

PCR Schritt	Zeit	Temperatur	
Initiale Aktivierung	10 min	95 °C	
Denaturierung	15 sek	95 °C	} 40 x
Annealing und Elongation	1 min	60 °C	
Schmelzkurve	15 sek	95 °C	
	1 min	55 °C g.a. ¹ bis 60 °C	
	30 sek	95 °C	
Finale Elongation	15 sek	60 °C	

¹g.a. = graduell ansteigend

Tabelle 15 Reagenzienmix zur Detektion von *A. phagocytophilum* in Kleinsäugetern mittels Real-Time PCR

Reagenzien*	µl / Reaktion
Universal fast TaqMan Mastermix	10,0 µl
Primer ApMsp2f (10 µM)	1,8 µl
Primer ApMsp2r (10 µM)	1,8 µl
Sonde ApMsp2p (10 µM)	0,4 µl
Molekularbiologisch reines H ₂ O	1,0 µl
Probe	5,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

* Applied Biosystems® TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®)

Tabelle 16 Thermoprofil der PCR zur Detektion von *A. phagocytophilum* in Kleinsäugern

PCR Schritt	Zeit	Temperatur	
Initiale Aktivierung	20 sek	95°C	
Denaturierung	3 sek	95°C	} 40x
Annealing und Elongation	30 sek	60°C	

Tabelle 17 Reagenzienmix zur Detektion von *A. phagocytophilum* mittels nested-PCR

Reagenzien* µl / Reaktion	1. Amplifikation	2. Amplifikation µl / Reaktion
Puffer 10x	5,0 µl	5,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,0 µl	1,0 µl
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	1,0 µl	1,0 µl
Primer ge3a bzw. ge9f (100 µM)	0,5 µl	0,5 µl
Primer ge10r bzw. ge2 (100 µM)	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

*HotStar Taq Plus DNA Polymerase Kit (Qiagen)

Tabelle 18 Thermoprofil der PCR zur Detektion von *A. phagocytophilum* mittels nested-PCR

PCR Schritt	Zeit	Temperatur	
1. Amplifikation			
Initiale Aktivierung	15 min	95 °C	
Denaturierung	30 sek	94 °C	} 40x
Annealing	30 sek	55 °C	
Elongation	1 min	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	
2. Amplifikation			
Initiale Aktivierung	15 min	95 °C	
Denaturierung	30 sek	94 °C	} 25x
Annealing	30 sek	55 °C	
Elongation	1 min	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	

*6x bei jedem Zyklus um ein halbes Grad steigend bis 50 °C erreicht sind dann 28 Zyklen lang wiederholen bei 50 °C

Tabelle 19 Reagenzienmix zur Detektion von *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* mittels Real-Time PCR

Reagenzien*	µl / Reaktion
Universal fast TaqMan MMX	10µl
Sonde NMikGroEL-P2a (10 µM)	0,4 µl
Primer r2 NMikGroEL rev2 (10 µM)	0,9 µl
Primer f NMikGroEL-F2 (10 µM)	1,8 µl
Primer r1 NMikGroEL rev1 (10 µM)	0,9 µl
Molekularbiologisch reines H ₂ O	1,0 µl
Probe	5,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

*Taq Man® fast Universal PCR Mastermix 2x, inkl. Hot Star DNA Polymerase (Applied Biosystems®)

Tabelle 20 Thermoprofil der PCR zur Detektion von *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*

PCR Schritt	Zeit	Temperatur	
Initiale Aktivierung	10 min	95 °C	
Denaturierung	25 sek	95 °C	} 45 x
Annealing und Elongation	30 sek	60 °C	

4.2.1. Auswertung konventioneller PCR Produkte

4.2.1.1. Gel-Elektrophorese

Bei der konventionellen PCR amplifizierte Produkte wanderten in einem 2 %igen Agarosegel (Top Vision Agarose, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), mit Gel Red (Gel Red® Nucleic Acid Stain, Biotium Hayward, USA) bei 200 V und 1,5 Ampere für 45 min in einer Kammer mit ionischer TRIS-Borat-EDTA-Pufferlösung (TBE). Zum Ablesen der Größe der Genfragmente lief ein DNA Längenstandard (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas) zum Vergleich mit. Mittels UV-Bestrahlung wurden die PCR-Produkte mit dem Dokumentationssystem Vision-Capt (ANALIS sa/nv Belgium, Suarlée, Belgien) dargestellt und anhand der Genfragmentlänge ausgewertet.

4.2.1.2. Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die aufgereinigte DNA-Menge und Qualität wurde mittels Nano Drop® (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) bestimmt.

4.2.1.3. Sequenzierung und Auswertung von Sequenzen

Aufgereinigte PCR-Produkte wurde mit Wasser von molekularbiologischer Qualität auf die Zielkonzentration von 5 ng/ μ l und einer Menge von insgesamt 15 μ l verdünnt und zur Sequenzierung bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) mit den dazugehörigen Vorwärts- und Rückwärtsprimern eingeschickt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms Chromas Lite® (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australien) ausgewertet. Durch das Programm Reverse Complement (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) wurden die erhaltenen Rückwärtssequenzen komplementiert und zugleich vom 5' zum 3' Ende gedreht. Die daraus entstandene Sequenz wurde mittels ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) mit der Vorwärtssequenz abgeglichen. Ausgewertete Sequenzen wurden mit dem Programm BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit Sequenzen aus der GenBank verglichen.

5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm Graph Pad Software Prism 6 (Graph Pad Software Inc., San Diego, Ca., USA) durchgeführt. Exakte Konfidenzintervalle (95 % CI) der Prävalenzen in gesaugten wie auch in wirtssuchenden Zecken und Mäusen wurden für die jeweiligen Pathogene, Standorte und Spezies mittels der Clopper & Pearson Methode bestimmt (Clopper und Pearson, 1934). Pearson's Chi-Quadrat Test mit dem Fehler 1. Art α von 0,05 wurde verwendet, um multiple Vergleiche der Prävalenzen zwischen den unterschiedlichen Mäusearten wie auch zwischen den unterschiedlichen Standorten festzustellen (Pearson, 1900). Der exakte Test nach Fisher (Fisher, 1935) wurde für Werte mit einer Häufigkeit $n < 5$ in weniger als 30 Fällen bestimmt. Die Bonferroni Korrektur wurde angewendet, um die Fehlerquelle des Chi-Quadrat-Tests bei multiplen Vergleichen auszugleichen (Bonferroni, 1959). Die Odds Ratio (95 % CI) wurde berechnet, um einen Vergleich zwischen den Prävalenzen von männlichen und weiblichen Rötelmäusen für *CNM* anzustellen (Mosteller, 1968). Zum Vergleich von Milz- bzw. Körpergewicht zwischen *B. microti* positiven und *B. microti* negativen Rötelmäusen wurde der einseitige Mann-Whitney-U Test mit α von 0,25 verwendet (Hodges und Lehmann, 1963).

IV. ERGEBNISSE

1. Publikation 1

***Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and *Anaplasma phagocytophilum*: prevalences and investigations on a new transmission path in small mammals and ixodid ticks**

Anna Obiegala^{1,2}, Martin Pfeffer², Kurt Pfister¹, Tim Tiedemann¹, Claudia Thiel¹, Anneliese Balling², Carolin Karnath², Dietlinde Woll², Cornelia Silaghi^{1,3}

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

²Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Leipzig,
Germany

³Institute of Parasitology, University of Zurich, Zurich, Switzerland

Parasites & Vectors 2014, 7:563 doi:10.1186/s13071-014-0563-x

Impact Factor: 3.25

Eingereicht: 14.06.2014

Akzeptiert: 24.11.2014

Veröffentlicht: 04.12.2014

***Candidatus* Neoehrlichia mikurensis and Anaplasma phagocytophilum: prevalences and investigations on a new transmission path in small mammals and ixodid ticks**

Anna Obiegala^{1, 2}, Martin Pfeffer², Kurt Pfister¹, Tim Tiedemann¹, Claudia Thiel¹, Anneliese Balling², Carolin Karnath², Dietlinde Woll², Cornelia Silaghi^{1, 3}

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

²Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Leipzig, Germany

³Institute of Parasitology, University of Zurich, Zurich, Switzerland

E-Mails: Pfeffer@vetmed.uni-leipzig.de, kurt.pfister@tropa.vetmed.uni-muenchen.de, Tim.Tiedemann@tropa.vetmed.uni-muenchen.de, Claudia.Thiel@tropa.vetmed.uni-muenchen.de, Anneliese.Balling@vetmed.uni-leipzig.de, Carolin.Karnath@vetmed.uni-leipzig.de, D_Woll@gmx.net, Cornelia.Silaghi@uzh.ch

Correspondence:

Anna Obiegala
Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health
University of Leipzig
An den Tierkliniken 1
D-04103 Leipzig
Germany

Phone: +49 - 341 - 97 38 166

Fax: +49 - 341 - 97 38 198

E-mail: Anna.Obiegala@vetmed.uni-leipzig.de

Abstract

Background: Small mammals are crucial for the life history of ixodid ticks, but their role and

importance in the transmission cycle of tick-borne pathogens is mostly unknown. *Candidatus* *Neoehrlichia mikurensis* (CNM) and *Anaplasma phagocytophilum* are both tick-borne pathogens, and rodents are discussed to serve as main reservoir hosts for CNM but not for the latter especially in Germany. Analyzing the prevalence of both pathogens in small mammals and their ticks in endemic regions may help to elucidate possible transmission paths in small mammal populations and between small mammals and ticks.

Methods: In 2012 and 2013, small mammals were trapped at three different sites in Germany. DNA was extracted from different small mammal tissues, from rodent neonates, foetuses and from questing and attached ticks. DNA samples were tested for CNM and *A. phagocytophilum* by real-time PCR. Samples positive for *A. phagocytophilum* were further characterized at the *16S rRNA* gene locus.

Results: CNM was detected in 28.6% of small mammals and in 2.2% of questing and 3.8% of attached ticks. Altogether 33 positive ticks were attached to 17 different hosts, while positive ticks per host ranged between one and seven. The prevalences for this pathogen differed significantly within small mammal populations comparing sites (χ^2 : 13.3987; p: 0.0004) and between sexes. Male rodents had an approximately two times higher chance of infection than females (OR: 1.9652; 95%CI: 1.32-2.92). The prevalence for CNM was 31.8% (95%CI: 22-44) in rodent foetuses and neonates (23 of 67) from positive dams, and 60% (95%CI: 35.7-80.25) of positive gravid or recently parturient rodents (9 out of 15) had at least one positive foetus or neonate. *Anaplasma phagocytophilum* was detected at a low percentage in rodents (0-5.6%) and host-attached ticks (0.5-2.9%) with no significant differences between rodent species. However, attached nymphs were significantly more often infected than attached larvae (χ^2 :25.091; p: <0.0001).

Conclusion: This study suggests that CNM is mainly a rodent-associated pathogen and provides evidence for a potential transplacental transmission in rodents. In contrast, most of the rodent species captured likely represent only accidental hosts for *A. phagocytophilum* at the investigated sites.

Keywords

Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*; *Anaplasma phagocytophilum*; *Ixodes ricinus*; Emerging Pathogen; Small Mammals; Tick-borne Pathogen.

Background

Small mammals play an essential role in the development of immature stages of hard ticks

that mainly feed on rodents [1, 2]. As wild rodents represent possible reservoir hosts for tick-borne pathogens, they may be important for the pathogens' preservation and distribution. Belonging to the rickettsial family Anaplasmataceae, the tick-borne pathogens *Candidatus Neohrlichia mikurensis* (CNM) and *Anaplasma phagocytophilum* are of considerable risk for human and animal health as they may cause life-threatening diseases [3, 4]. *Ixodes ricinus*, the most common vector for zoonotic pathogens in Europe [5, 6], is known to transmit *A. phagocytophilum* and suspected to transmit CNM to animals and humans [7, 8]. However, transovarial transmission in this tick species has not been reported for either of these pathogens [7, 8]. Consequently, mammalian hosts are essential for the transmission in natural life cycles of these bacteria [8, 9, 10, 11, 12]. CNM is an emerging pathogen first discovered as an *Ehrlichia*-like species in *I. ricinus* ticks from the Netherlands in 1999 [13]- Later, it was found in wild rats (*Rattus norvegicus*) and *I. ovatus* ticks from Japan [14]. It was observed in 11 humans [15] with immune deficiency from Europe over the last decade causing unspecific symptoms such as fever, septicaemia and weight loss [2, 16, 17]. Additionally, it was detected in dogs from Germany and Nigeria [18, 19] and found widespread in *Ixodes* species from Europe [7, 20] and Asia [14]. Wild rodent species from several Eurasian countries were investigated and found positive for this pathogen as well [9, 10, 11, 12, 21], suggesting their role as reservoir hosts. So far, CNM could not be cultivated *in vitro*, and epidemiological research on reservoir hosts is still incomplete.

Anaplasma phagocytophilum is an obligatory intracellular bacterium that causes granulocytic anaplasmosis in humans, dogs, horses and ruminants [8]. While reports of human granulocytic anaplasmosis in Europe are rare [8, 22], *A. phagocytophilum* infections in U.S. residents are more frequent [23]. The different extent of virulence of the various *A. phagocytophilum* strains may account for this phenomenon, as the most virulent strain is most common in the USA but most probably rare in Europe [23]. Whilst wild ruminant species are expected to be reservoirs [24, 25, 26], rodent species may likewise serve as hosts [8, 27]. Low prevalences for *A. phagocytophilum* were reported in rodent species such as bank voles and yellow-necked mice from Europe [28, 29]. Humans and animals are therefore at risk of infection both by *A. phagocytophilum* and by CNM, however, knowledge on possible reservoir hosts, their distribution and the transmission patterns of these pathogens is still sparse. Thus, this study's objectives were:

(i) Detection of CNM and *A. phagocytophilum* in small mammals and their ticks and comparison of their respective prevalence rates from three differently structured areas in Germany

- (ii) Detection of CNM in questing ticks from two different sites over a period of five years
- (iii) Evaluation of a possible transmission path for CNM in rodents

Methods

Study sites

Locations were identical to study sites selected in former studies by our group, in order to collect questing ticks. Traps were placed along those sites [28, 31].

Urban area (R1)

The area “Dörnbergpark” (7.4 ha, 49°00'55.72''N, 12°05'08.89''E) is situated in the city centre of Regensburg, Bavaria, Southern Germany. It is a small park (7.4 ha), surrounded by walls, with strong anthropogenic influence which is expressed by a high frequency of visitors spending their leisure time there. The site is a well-tended park with mostly grassy landscape and only a few old trees such as oaks and maples. Large wild mammals like roe deer and wild boar are not present [30]. The park was described before [31].

Sylvatic area (T)

The site “Angelberger Forst” (641 ha, 48°06'36.42''N, 10°34'33.40''E), located near Tussenhausen, Bavaria, is a large forest (641 ha) with low anthropogenic influence. This mixed forest is mainly dominated by beeches, oaks and spruces. Different wild animal species are present, and the frequency of visitors is low. Therefore, there is little to no interaction between wild and domestic animals and humans [32]. A detailed description has been given before [24, 31].

Renaturated area (S)

The third site (51°15'32.2"N, 12°21'02.5"E, 51°17'01.3"N, 12°21'00.6"E, 51°26'97.2"N, 12°32'25.6"E), located in Saxony, Eastern Germany, is part of the “Leipziger Neuseenland” (www.leipzigerneuseenland.de), a former open pit brown coal mining region near the city of Leipzig, which has been renaturated. The study site partially surrounds one of 20 artificially created lakes, called “Lake Cospuden” (436 ha). Bushes and trees less than 20 years old characterize this site. The region is a recreational area with a high frequency of visitors. Large wild animals such as wild boar and roe deer are present. The site is characterized by a sympatric existence of *I. ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks and it is divided in three parts, formerly described as sites E, F and G [28].

Sampling of small mammals and their ticks

In 2012 and 2013, small mammals were collected with Sherman© live animal traps (H. B. Sherman Traps, Inc., Tallahassee, Fla., U.S.A.) at all three study sites (official permit Site S: AZ 36.11-36.45.12/4/12-001, Site R1: 55.1-8646.4-140, Site T: 55.1-8646-2/30). Traps, baited with apple slices, were placed for at least two consecutive nights per month and site and were checked twice a day. For both Bavarian sites, 50 traps each were set up between July and October in 2012 and between April and September in 2013. In Saxony, small mammals were captured with 60 traps between March and October in 2012 and between January and September in 2013. Collected animals were anaesthetized with CO₂ to sample blood by cardiac puncture and then euthanized by cervical dislocation and stored at -80 °C. We identified all mammals using taxonomic keys [33]. Furthermore, conventional PCR targeting the *cytochrome b* gene [34] yielding an amplicon of 354 base pairs was performed to verify morphological identification for 15 randomly selected wood mice, 14 bank voles and 23 yellow-necked mice and all shrews, common voles, mouse weasels and field voles. Complete necropsy was carried out with collection of biometric data of all small mammals' internal organs. The uteri of female gravid rodents were opened with sterile scissors. Foetuses were cut out of the amniotic sac avoiding contact with the outer surface, each with a sterile scalpel. However, contamination with maternal blood could not always be excluded. Small mammals were searched for ticks, which were stored frozen at -20 °C and then identified with standard taxonomic keys [35]. From those we selected five ticks per developmental stage and per species for further analysis from at least 30 individuals per mammal species per year and site.

Questing ticks

Questing ticks from former studies

A total of 2,146 questing *I. ricinus* ticks were available from former studies of our group [24, 36, Gomez Chamorro *et al.* unpublished]. Questing ticks were collected with a 1m² sized cotton flag, which was attached to a wooden stick, on a 300m² area, divided in three parts of 100 m². Questing ticks were collected once in the second or third week of the month from April to June in the years 2009 to 2013 at the urban site and in the years 2011 to 2012 respectively at the sylvatic site. More details are shown in former studies [24, 36]. In these past studies, ticks were morphologically identified and DNA was isolated in order to detect *A. phagocytophilum* (Table 1).

Questing ticks from this study

Additionally, we collected ticks by flagging at site T from April to June 2013. They were identified and processed for molecular analysis like the attached ticks (Table 2).

DNA Extraction

Ticks were disrupted in separate tubes containing 300 µl PBS and a steel bead using the Tissue Lyser I (Qiagen, Hilden, Germany) at 20 Hz for 5 minutes. Spleen samples weighed between 0.01 and 0.05 g, depending on the small mammals' spleen sizes. Each foetus was extracted separately in a whole piece. After addition of 300 µl lysis buffer and 30 µl proteinase K to each sample, ticks and small mammal samples were incubated overnight and blood samples (200 µl) for over 20 minutes at 56 °C in a thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Germany). DNA was extracted with the Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit (Promega GmbH, Mannheim, Germany) and the corresponding Maxwell® 16 System (Promega GmbH) as recommended by the manufacturer. Quantity and quality of the extracted DNA samples were determined with a spectrophotometer (Nano Drop ND-1000, Erlangen, Germany).

PCR Methods

In order to detect CNM in small mammal and tick samples, a previously published real-time PCR targeting the *groEL* gene [7], was modified and carried out as described [9]. Tick and the small mammals' spleen DNA were screened for CNM by real-time PCR. Blood and foetuses were also analysed from the gravid rodents whose spleen tested CNM-positive. Neonates from one positive dam were likewise analysed. A real-time PCR targeting the *msp2* gene of *A. phagocytophilum* [37, 38] was performed with tick DNA in the AB-7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) and with DNA from the small mammals' blood, and spleen in the AB-7500 FAST Real Time PCR System (Applied Biosystems) [24]. Positive samples were further characterized at the *16S rRNA* gene locus [39, 38, 40, 41] by using a nested-PCR as described [24]. Using the QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen), PCR products were purified and sequenced by a commercial company (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany). Sequencing was performed with forward and reverse primers used for PCR amplification. Results were analysed with the Chromas Lite program (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia). Sequences were aligned to available sequences in the GenBank with BLASTn (National Center for Biotechnology Information, Bethesda MD, USA)[24] and also compared to sequences obtained in earlier studies [13, 25, 36, 39].

Statistical analysis

Confidence intervals (95%CI) for prevalences in small mammals, questing and attached ticks were determined by the Clopper and Pearson method using the Graph Pad Software (Graph Pad Software Inc., San Diego, Ca., USA). Pearson's chi-squared test was used with a type I error α of 0.05 to test the independence of compared prevalences. Fisher's exact test was used for small sample sizes tested ($n < 30$). The Bonferroni correction was used when making multiple comparisons with Pearson's chi-squared tests. Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (95% CI) were computed to compare prevalences in female and male rodents.

Results

Trapping of small mammals

Altogether 631 small mammals of ten different species were caught of which blood ($n=443$) and spleen ($n=594$) samples were available (Table 3). From all sites, we collected 332 foetuses/neonates from altogether 73 dams (8 from site T, 1 from site R1 and 64 from site S). We selected 63 foetuses and 4 neonates, born in a trap, for further analysis as they derived from dams ($n=15$) tested positive for CNM (Table 4).

Ticks attached on small mammals

In total, we collected ticks from 449 out of the 631 small mammals. Apart from the field vole (*Microtus agrestis*) and the common mole (*Talpa europaea*), all other eight animal species were infested with ticks. Tick infestation rates ranged from 1 to 112 ticks with a mean infestation of 8 ticks and a median infestation of 16 ticks per small mammal. The mean infestation rates did not differ between infested male and female small mammals (χ^2 : 0.8933; p : 0.3446). With the multistage sampling strategy mentioned above, we ended up with 965 ticks of three different species (*I. ricinus*, *D. reticulatus*, *I. trianguliceps*) from altogether 186 rodents for further analysis (Table 5).

Questing ticks from this study

In 2013, we collected 989 *I. ricinus* ticks at site T in total. Altogether 205 selected ticks were analysed for this study (Table 2).

PCR analysis for CNM in small mammals

CNM was detected in four rodent species (*Microtus arvalis*, *Myodes glareolus*, *A. sylvaticus*, *A. flavicollis*), with prevalences ranging from 2.8% to 31.6% (Table 6). Regarding prevalences

in the two main species, *My. glareolus* and *A. flavicollis*, no significant difference (χ^2 : 0.7; p: 0.4) was found. The prevalence in wood mice (*A. sylvaticus*) was significantly lower than in the two main species (*A. flavicollis* and *My. glareolus*) (χ^2 : 13.3987; p: 0.0004). Comparing the prevalence between 2012 (27.2%; 95%CI: 24-31) and 2013 (37.4%; 95%CI: 28-48), a significantly higher prevalence was observed in 2013 (χ^2 : 3.915; p: 0.048) for sites T and site S, but not for site R1. Gender distribution between *A. flavicollis* and *My. glareolus* was approximately equal (282 females; 303 males), but the prevalence of CNM in *My. glareolus* and *A. flavicollis* was significantly higher (χ^2 : 5.855; p: 0.016) in males (65.0%; 95%CI: 48-78) than in females (35.0%; 95%CI: 26-44.36). Males have a 96.5% (OR: 1.9652; 95%CI: 1.32-2.92) higher chance than females to be infected. The prevalence for CNM was 31.8% (95%CI: 22-44) in foetuses and neonates (23 of 67), from 9 out of 15 positive gravid or recently parturient rodents. These nine animals belonged to three species: *My. glareolus*, *A. flavicollis*, and *Mi. arvalis* (Table 4).

PCR analysis for CNM in attached ticks

Altogether 33 out of 965 (3.8%; 95%CI: 3-5) ticks attached to small mammals were positive for CNM (Table 5). Comparing all sites, we did not count the number of positive ticks but the number of hosts from which positive ticks were collected and the prevalence in attached *I. ricinus* ticks at site S was significantly higher (χ^2 : 14.3169.268; p:0.0008) than at both Bavarian sites. Positive larvae were exclusively collected from CNM positive rodents.

PCR analysis for CNM in questing ticks

Altogether 51 out of 2,315 (2.2%; 95%CI: 2-3) questing ticks at both Bavarian sites were positive (Figure 1, Figure 2). No significant differences were detected between sites (χ^2 : 2.1576; p: 0.1419) or between adult and sub-adult tick stages (χ^2 : 1.723; p: 0.189). There was no significant difference (χ^2 : 3.8122, p: 0.1432) at site R1 between years from 2009 to 2013 (2009: 8/225; 2010: 3/180; 2011: 7/364; 2012: 7/355; 3/261). However, there was a significant difference between the years at site T, pointing out that the highest prevalence was detected (χ^2 : 8.7623; p: 0.0125) in 2012 (17/ 426) compared to 2011 (4/344) and 2013 (2/203).

Real-time PCR analysis for *A. phagocytophilum* in small mammals and attached ticks

In total, 7 out of 631 (1.1%; 95%CI: 0.5-2) small mammals were positive for *A. phagocytophilum*: 2/36 (5.6%; 95%CI: 1-19) wood mice from site R1, 1/243 (0.04%; 95%CI: 0-2.5) small mammals (bank vole) at site T, and 4/352 (1.1%; 95%CI: 0-3) small mammals (2

bank voles, 1 common vole, 1 yellow-necked mouse) at site S. *Anaplasma phagocytophilum* was neither identified in striped field mice, shrews, moles, mouse weasels nor in the only field vole. Comparing years, species and locations, no significant differences were found.

With regard to *A. phagocytophilum* in attached ticks, 16 out of 965 (1.7%; 95%CI: 1-3) were positive: 1/94 (1%; 95%CI: 0-6) *I. ricinus* (nymph) from R1, 2/374 (0.5%; 95%CI: 0-2) *I. ricinus* (larvae) from site T, and 13/450 (2.9%; 95%CI: 1.7-5) *I. ricinus* ticks (6 larvae, 7 nymphs) from site S. Nymphs were significantly more often infected (χ^2 :25.091; p : <0.0001) than larvae. *I. trianguliceps* and *D. reticulatus* ticks tested negative for DNA of *A. phagocytophilum*.

***Anaplasma phagocytophilum* nested-PCR and sequence analysis**

Altogether 21 of the 23 real-time PCR-positive samples had a CT-value between 30 and 36.8. The nested-PCR targeting the *16S rRNA* gene was only successful for the 2 samples with a CT-value below 30. Sequencing analysis of *A. phagocytophilum* of the two attached *I. ricinus* nymphs (1 from a wood mouse at site R1; GenBank acc.-No.: KJ769155; 1 from a bank vole from site S; acc.-No.: KJ769156) revealed gene variant “A”, as described [40], for both.

Discussion

CNM in small mammals

The prevalences in rodents from our study were similar or even higher (2.8-41.2) in comparison to those from former studies from Germany (33-65%) [9], the Netherlands (0-25%) [7], France (1.8%) [1], Italy (2.9%) [10], Sweden (0-10%) [11] and Switzerland (3.9%) [42]. Site S is the only site where *Microtus* species were captured, admittedly in small numbers ($n=8$) but with high prevalence for CNM (57-100%). These findings are similar to those observed in other studies from Germany (37-100%) [12] and the Netherlands (25%) [7], where *Microtus* spp. also were rarely caught in forested environments [7, 12]. The lowest prevalence for CNM in rodents (2.8%) was detected at site R1, the study site with an exclusive occurrence of wood mice and the lowest number of captured individuals ($n=36$) in total. The low number of captured animals may be explained by the structure of this study site, as it is a very small park with strong anthropogenic influence. Although studies from Sweden and the Netherlands [7, 11] observed that wood mice are infected with CNM at a high percentage (10-22%) we found a low prevalence in this rodent species (2.8%) which is comparable to findings from another German study (0%) [12]. These divergent results suggest that prevalence rates in wood mice may depend on their living conditions. Taken together, the

prevalences in *Microtus* species and the maximum range (0-100%) of prevalences for CNM in all captured species (Table 6), lead to the assumption that the infection rate of CNM depends on the rodent species. The lack of CNM detection in insectivores is in line with previous studies providing further evidence that insectivores most likely are not involved in the transmission cycle of this pathogen [7, 9, 11]. We found a sex-related bias (OR: 1.97) for CNM in male bank voles and yellow-necked mice. Similar findings were reported in bank voles for the rodent-borne Puumala virus (OR: 1.84) [43]. In that study, the discrepancy was explained by the males' higher activity rate [43, 44], which may be the same explanation for the bias for CNM in our study. A recent study described the lack of CNM infection in juvenile bank voles in Southern Sweden [45]. In strong contrast to this finding, we detected CNM in three of 4 new-born bank voles from a positive dam. Foetuses from 9 of 14 positive pregnant animals were positive for CNM and belonged to three different species (*Mi. arvalis*, *A. flavicollis*, *My. glareolus*) (Table 4). Although contamination with maternal blood during the necropsy cannot be fully excluded, this indicates the possibility of transplacental transmission in these rodent species and that it may well be expected as a main transmission mode in nature. However, experimental investigations are needed to prove this hypothesis.

CNM in attached ticks

Considering that results in small mammals and attached ticks are related, as ticks may feed on the mammals' infected blood, it is not surprising that the highest infection rate in attached ticks was observed at site S where the highest prevalence in small mammals was achieved compared to all other sites and that the prevalences in attached ticks were generally lower than in rodents. The prevalence for CNM in attached nymphs from site S was similar to the prevalence in questing nymphs and adults from a former study from this site [9]. The reason for similar results in sub-adult and adult stages could be a lack of exposure of adult ticks to CNM, as they preferably feed on larger wild mammals that apparently do not harbour CNM at a high percentage. Reports of low prevalences (6-8%) in adult ticks collected from larger mammals, such as red deer and wild boar, were already published [7]. Former studies suggested that transovarial transmission does not occur in *I. ricinus* ticks [7, 9, 42]. This hypothesis is supported by our study in which positive larvae derived exclusively from positive rodents, and all questing larvae were negative.

CNM in questing ticks

While a previous study showed that prevalences in questing ticks differed over a wide range (0-45%) at site S during 2008 and 2009 [9], the infection rates at site T and site R1 (2.2%)

from our study were generally low over the years. They did not differ between developmental stages, locations and the years from 2009 to 2013 at site R1. The fact that the prevalence in rodents (28.6%) is approximately ten times higher than in attached (3.8%) and questing ticks (2.2%) and that transplacental transmission in rodents is most likely, provides strong evidence that CNM is mainly a rodent-associated pathogen. A recent study also showed that small mammals transmit CNM to xenodiagnostic *I. ricinus* larvae by a high percentage (41%) which also confirmed the reservoir function of this group of mammals [42].

PCR results for *A. phagocytophilum* in rodents

While white-footed mice, eastern chipmunks and short-tailed shrews are implicated to be reservoirs for the human pathogenic sequence type (Ap –ha) of *A. phagocytophilum* in the U. S. [46, 47], there is no equivalent small mammal species reported as reservoir for this type in Europe yet. *Anaplasma phagocytophilum* was recently described to have four ecotypes with different host preferences in Europe: Ecotype I covers a wide range of different hosts and is expected to be pathogenic for humans, and to be transmitted by *I. ricinus* ticks, while ecotype II was described to be adapted to wild ungulates. Ecotype III, described to be non-pathogenic, is adapted to small mammal hosts and *I. trianguliceps* ticks [48] and ecotype IV is described to be associated with bird species but not with any other vertebrate species. Bown et al. also suggested that voles and roe deer exist in two enzootic co-existing cycles for different *A. phagocytophilum* strains [49] which was supported by two recent studies from Slovakia and Northern Italy [50, 51]. Moreover, Bown et al. [27] claimed that in particular common voles could be possible reservoirs for *A. phagocytophilum* and involved in its enzootic life cycle together with *I. trianguliceps* ticks. We do not refute this statement as one out of 7 (14.3%) common voles was positive in our study. Furthermore the hypothesis of different ecotypes with a differing range of host preferences is supported by other data from our group, as we detected a high prevalence for *A. phagocytophilum* (98.9%) in wild ungulates at site T in a former study [24]. In strong contrast to this finding the prevalences in captured small mammals at this and at both of the other sites was very low (0- 5.6%) in the present study. These findings are in line with previous low prevalences in small mammals from Europe [28, 29]. Therefore, our study provides no evidence for both mainly captured rodent species, *A. flavicollis* and *My. glareolus* as main reservoir hosts for *A. phagocytophilum*, but support that common voles may well be reservoirs for a certain ecotype of this pathogen. Xenodiagnostic experiments with *I. ricinus* larvae in a recent study also showed that *Apodemus* and *Myodes* species did not transmit *A. phagocytophilum* [42]. These results further support the aforementioned hypothesis.

PCR results and gene variants for *A. phagocytophilum* in attached ticks

Detection rates for *A. phagocytophilum* were low in attached ticks from all sites and no significant differences between sites and years were noticed. The prevalences are comparable to those in rodents and to those from a recent study from Switzerland, where prevalences in attached ticks were 0% [42]. In the present study *I. ricinus* nymphs were more often infected than larvae, highlighting the possible transstadial transmission in *I. ricinus*. Infected nymphs probably fed as larvae on other vertebrate species such as hedgehogs, which may have higher infection rates of *A. phagocytophilum* [52, 53]. For both positively tested nymphs, gene variant “A” [GenBank: KJ769156, KJ769156] was detected which was reported in ticks, hedgehogs, dogs, horses, a cat and a human patient before, but not in rodents and neither in ruminants [39, 40, 54, 55, 56, 57]. While this gene variant was mainly reported in ticks from urban areas [52] this result is plausible for our study, as one of those positive nymphs derived from the urban site R1 and the other from the renaturated site S. Rodents were discussed to be reservoirs at site R1 [52]. In contrast to this assumption, we detected a low capture rate for rodents and a likewise low prevalence in these animals from site R1. As prevalences in questing ticks from this site were high (16.3-23%) [52], other vertebrates such as hedgehogs and birds [52, 53] probably act as potential reservoirs. Moreover, the low prevalence of CNM in rodents and the higher prevalence in questing ticks from this site strengthen the assumption of other vertebrate hosts for CNM at site R1, since hedgehogs were positive for both *A. phagocytophilum* (76.1%) and CNM (2.3%) in a previous study from an urban area in Hungary [58]. The low prevalence for *A. phagocytophilum* in attached larvae further endorses the hypothesis that rodents may not be the main reservoir hosts for this pathogen, at least for certain variants.

Conclusion

Our results strongly indicate that CNM is primarily a rodent-associated pathogen based on its high prevalence in rodents and their neonates when compared to its prevalence in ticks. CNM may be very efficiently transmitted transplacentally within rodent populations and not only via tick bites. In contrast, the low detection rate for *A. phagocytophilum* in most of all captured rodent species and host-attached ticks indicates that these rodents may serve as incidental carriers. However common voles may well be suggested as reservoirs for *A. phagocytophilum*.

Authors' contributions

AO, MP, DW, AB, TT and CK organized and participated in the fieldwork for the collection of wildlife samples. AO, TT, CT and CS carried out the morphologic determination of ticks. AO, TT, CT, DW, MP, AB and CK prepared the samples in the laboratory. AO, TT and CT tested the samples for CNM and *A. phagocytophilum*. AO and CS performed the sequence analysis. AO, CS and MP drafted the manuscript and wrote the final version. CS, MP and KP organized and planned the study. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments and Funding

Authors wish to thank Olcay Hekimoglu and Sarah Wagner for excellent technical assistance. The authors thank Andrea Chamorro, Evelyn Overzier and Sabine Poljak for providing questing tick samples. Furthermore, the authors thank Uwe Birett, Rayan Ababneh, Jennifer Krieg, Daniela Sum, Tessa Foerster, Franziska Eller and Claudia Kehler for help in rodent trapping. Alexander Mathis is gratefully acknowledged for a critical review of the manuscript. This study was partially funded by EUgrant FP7-261504 EDENext and is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext233 (<http://www.edenext.eu/>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission. The Federal Environment Agency of Germany (FKZ 371148) also funded part of this project and Bayer AG (Leverkusen, Germany) financed the processing charge for this article. The work of AO, MP, CS and KP was done under the frame of EurNegVec COST Action TD1303.

References

1. Vayssier-Taussat M, Le Rhun D, Buffet J-P, Maaoui N, Galan M, Guivier E, Charbonnel N, Cosson J-F: ***Candidatus Neohrlichia mikurensis* in bank voles, France.** *Emerging Infect Dis* 2012, **18**(12):2063-2065.
2. Fehr JS, Bloemberg GV, Ritter C, Hombach M, Luscher TF, Weber R, Keller PM: **Septicemia caused by tick-borne bacterial pathogen *Candidatus Neohrlichia mikurensis*.** *Emerg Infect Dis* 2010, **16**: 1127–1129.
3. Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N and Bakken JS: **Ehrlichioses in Humans: Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment.** *Clin Infect Dis* 2007,

45(Suppl 1): 45-51.

4. Li H, Jiang J-F, Liu W, Zheng Y-C, Huo Q-B, Tang K, Zuo S-Y, Liu K, Jiang B-G, Yang H, Cao W-C: **Human Infection with *Candidatus Neohrlichia mikurensis*, China.** *Emerg Infect Dis* 2012, **18**(10): 1636-1639.

5. Heyman P, Cochez C, Hofhuis A, van der Giessen J, Sprong H, Porter SR, Losson B, Saegermann C, Donoso-Mantke O, Niedrig M, Papa A : **A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe.** *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010, **8**(1):33-50.

6. Gern L: **Die Biologie der *Ixodes ricinus* Zecke.** *Therapeutische Umschau* 2005, **62**(11):707-712.

7. Jahfari S, Fonville M, Hengeveld P, Reusken C, Scholte EJ, Takken W, Heyman P, Medlock J, Heylen D, Kleve J, Sprong H: **Prevalence of *Neohrlichia mikurensis* in ticks and rodents from north-west Europe.** *Parasit Vectors* 2012, **5**:74.

8. Woldehiwet Z: **The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*.** *Vet Parasitol* 2010, **167**(2-4):108-22.

9. Silaghi C, Woll D, Mahling M, Pfister K, and Pfeffer M: ***Candidatus Neohrlichia mikurensis* in rodents in an area with sympatric existence of the hard ticks *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*, Germany.** *Parasit Vectors* 2012, **5**:285.

10. Beninati T, Piccolo G, Rizzoli A, Genchi C, Bandi C: **Anaplasmatataceae in wild rodents and roe deer from Trento Province (northern Italy).** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006, **25**:677–678.

11. Andersson M, Råberg L: **Wild rodents and novel human pathogen *Candidatus Neohrlichia mikurensis*, Southern Sweden.** *Emerg Infect Dis* 2011, **17**:1716–1718.

12. Krücken J, Schreiber C, Maaz D, Kohn M, Demeler J, Beck S, Schein E, Olias P, Richter D, Matuschka FR, Pachnicke S, Krieger K, Kohn B, von Samson-Himmelstjerna G: **A novel high-resolution melt PCR assay discriminates *Anaplasma phagocytophilum* and „*Candidatus Neohrlichia mikurensis*“.** *J Clin Microbiol* 2013, **51**(6): 1958-61.

13. Schouls LM, Van De Pol I, Rijpkema SGT, Schot CS: **Detection and Identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato, and *Bartonella* Species in Dutch *Ixodes ricinus* Ticks.** *J Clin Microbiol* 1999, **37**(7): 2215-2222.

14. Kawahara M, Rikihisa Y, Isogai E, Takahashi M, Misumi H, Suto C, Shibata S, Zhang C, Tsuji M: **Ultrastructure and phylogenetic analysis of ‘*Candidatus Neohrlichia mikurensis*’ in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2004, **54**:1837–1843.
15. Grankvist A, Andersson P-O, Mattsson M, Sender M, Vaht K, Höper L, Sakiniene E, Trysberg E, Stenson M, Fehr J, Pekova S, Bogdan C, Bloemberg G, Wennerås C: **Infections with the tick-borne bacterium “*Candidatus Neohrlichia mikurensis*” mimic non-infectious conditions in patients with B cell malignancies or autoimmune diseases.** *Clin Infect Dis* 2014, Advance access 10.1093/cid/ciu189.
16. von Loewenich FD, Geissdorfer W, Disque C, Matten J, Schett G, Sakka SG, Bogdan C: **Detection of “*Candidatus Neohrlichia mikurensis*” in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant.** *J Clin Microbiol* 2010, **48**:2630–2635.
17. Welinder-Olsson C, Kjellin E, Vaht K, Jacobsson S, Wennerås C: **First case of human “*Candidatus Neohrlichia mikurensis*” infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia.** *J Clin Microbiol* 2010, **48**:1956–1959.
18. Diniz PP, Schulz BS, Hartmann K, Breitschwerdt EB: **“*Candidatus Neohrlichia mikurensis*” infection in a dog from Germany.** *J Clin Microbiol* 2011, **49**: 2059–2062.
19. Kamani J, Baneth G, Mumcuoglu KY, Waziri NE, Eyal O, Guthmann Y, Harrus S: **Molecular detection and characterization of tick-borne pathogens in dogs and ticks from Nigeria.** *PLoS Negl Trop Dis* 2013, **7**(3):e2108.
20. Richter D, Matuschka FR: **“*Candidatus Neohrlichia mikurensis*,” *Anaplasma phagocytophilum*, and lyme disease spirochetes in questing european vector ticks and in feeding ticks removed from people.** *J Clin Microbiol* 2012, **50**:943–947.
21. Tabara K, Arai S, Kawabuchi T, Itagaki A, Ishihara C, Satoh H, Okabe N, Tsuji M: **Molecular Survey of *Babesia microti*, *Ehrlichia* Species and *Candidatus Neohrlichia mikurensis* in wild rodents from Shimane Prefecture, Japan.** *Microbiol Immunol* 2007, **51**(4):359-367.
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**(3): 589-595.

23. Stuen S, Granquist EG, Silaghi C: ***Anaplasma phagocytophilum*- a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies.** *Front Cell Infect Microbiol* 2013, **3**:31.
24. Overzier E, Pfister K, Herb I, Mahling M, Böck Jr G, Silaghi C: **Detection of tick-borne pathogens in roe deer (*Capreolus capreolus*), questing ticks (*Ixodes ricinus*) and ticks infesting roe deer in southern Germany.** *Ticks Tick Borne Dis* 2013b, **4**:320–328.
25. Silaghi C, Hamel D, Pfister K, Rehbein S: ***Babesia* species and co-infection with *Anaplasma phagocytophilum* in free-ranging ungulates from Tyrol (Austria).** *Tierärztliche Mschr -Vet Med Austria* 2011a, **98**: 268–274.
26. Massung RF, Courtney JW, Hiratzka SL, Pitzer VE, Smith G, Dryden RL: ***Anaplasma phagocytophilum* in white-tailed deer.** *Emerg Infect Dis* 2005, **11**(10):1604-6.
27. Bown KJ, Negon M, Bennett M, Woldehiwet Z, Odgen NH: **Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*I. trianguliceps*) system, United Kingdom.** *Emerg Infect Dis* 2003, **9**:63-70.
28. Silaghi C, Woll D, Hamel D, Pfister K, Mahling M and Pfeffer M: ***Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks, ticks parasitizing rodents and the parasitized rodents – Analyzing the host pathogen-vector interface in a metropolitan area.** *Parasit Vectors* 2012, **5**:191.
29. Barandika JF, Hurtado A, García-Esteban C, Gil H, Escudero R, Barral M, Jado I, Juste RA, Anda P, García-Pérez AL: **Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain.** *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**(19):6166-6171.
30. Stadt Regensburg Umweltreferat-Gartenamt: **Der Dörnbergpark in Regensburg: Parkpfliegewerk Geschichte, Bestand, Zukunft**, 1996; ISBN-Nr.: 3-925753-53-2.
31. Overzier E, Pfister K, Thiel C, Herb I, Mahling M, Silaghi C: **Diversity of *Babesia* and *Rickettsia* Species in Questing *Ixodes ricinus*: A Longitudinal Study in Urban, Pasture, and Natural Habitats.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2013, **13**: 559-564.
32. Forstdirektion Oberbayern-Schwaben: **Managementplan zum FFH-Gebiet 7829-301 “Angelberger Forst“**, 2004.
33. Stresemann E: *Exkursionsfauna von Deutschland, Wirbeltiere, Volume 3*. Heidelberg:

Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer;1989.

34. Parson W, Pegoraro K, Niederstätter H, Föger M, Steinlechner M: **Species identification by means of the cytochrome b gene.** *Int J Legal Med* 2000, **114**:23–28.

35. Hillyard PD: **Ticks of North-West Europe Synopses of the British Fauna No. 52.** *The Linnean Society of London*, London, 1996.

36. Schorn S, Pfister K, Reulen H, Mahling M, Manitz J, Thiel C, Silaghi C: **Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany.** *Ticks Tick Borne* 2011a, **2**: 196–203.

37. 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.

38. Silaghi C, Kauffmann M, Passos LM, Pfister K, Zweygarth E: **Isolation, propagation and preliminary characterisation of *Anaplasma phagocytophilum* from roe deer (*Capreolus capreolus*) in the tick cell line IDE8.** *Ticks Tick-borne Dis* 2011, **2**:204–208.

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

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

41. Massung RF, Slater K, Owens JH, Nicholson WL, Mather TN, Solberg VB, Olson JG: **Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae.** *J Clin Microbiol* 1998, **36**:1090–1095.

42. Burri C, Schumann O, Schumann C, Gern L: **Are *Apodemus* spp. Mice and *Myodes glareolus* reservoirs for *Borrelia miyamotoi*, *Candidatus Neohrlichia mikurensis*, *Rickettsia helvetica*, *R. monacensis* and *Anaplasma phagocytophilum*?** *Tick Tick Borne Dis* 2014, **5** (3): 245-251.

43. Olsson GE, White N, Ahlm C, Elgh F, Verlemyr A-C, Juto P, Palo RT: **Demographic factors associated with hantavirus infection in bank voles – *Clethrionomys glareolus*.** *Emerg Infect Dis* 2002, **9**(10):924-929.

44. Mills JN, Ksiazek TG, Peters CJ, Childs JE: **Long-term studies of hantavirus**

- reservoir populations in the southwestern United States: a synthesis.** *Emerg Infect Dis* 1999, **5**(1): 135–142.
45. Andersson M, Scherman K, Råberg L: **Infection dynamics of the tick-borne pathogen *Candidatus Neorhlichia mikurensis* and co-infections with *Borrelia afzelii* in bank voles in Southern Sweden.** *Appl Environ Microbiol* 2013, **80**(5): 1645-1649.
46. Telford SR 3rd, Dawson JE, Katavolos P, Warner CK, Kolbert CP, Persing DH: **Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93**: 6209-14.
47. Keesing F, Hersh MH, Tibbetts M, McHenry DJ, Duerr S, Brunner J, Killilea M, LoGiudice K, Schmidt KA, Ostfeld RS: **Reservoir competence of vertebrate hosts for *Anaplasma phagocytophilum*.** *Emerg Infect Dis* 2012, **18** (12):2013-2016.
48. Jahfari S, Coipan C, Fonville M, van Leeuwen AD, Hengeveld P, Heylen D, Heyman P, van Maanen C, Butler CM, Földvári G, Szekeres S, van Duijvendijk G, Tack W, Rijks JM, van der Giessen J, Takken W, van Wieren SE, Takumi K, Sprong H: **Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe.** *Parasit Vectors* 2014, **7**:365.
49. Bown KJ, Lambin X, Ogden NH, Begon M, Telford G, Woldehiwet Z, Birtles RJ: **Delineating *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in coexisting, discrete enzootic cycles.** *Emerg Infect Dis* 2009, **15**(12): 1948-54.
50. Blanarová L, Stanko M, Carpi G, Miklisová, Víchová B, Mosanský L, Bona M, Derdáková M: **Distinct *Anaplasma phagocytophilum* genotypes associated with *Ixodes trianguliceps* ticks and rodents in Central Europe.** *Ticks Tick Borne Dis* 2014, in press.
51. Baráková I, Derdáková M, Carpi G, Rosso F, Collini M, Tagliapietra V, Ramponi C, Hauffe HC, Rizzoli A: **Genetic and ecologic Variability among *Anaplasma phagocytophilum* strains, Northern Italy.** *Emerg Infect Dis* 2014, **20**(6): 1082-1084.
52. Overzier E, Pfister K, Thiel C, Herb I, Mahling M, Silaghi C: ***Anaplasma phagocytophilum* in Questing *Ixodes ricinus* Ticks: Comparison of Prevalences and Partial 16S rRNA Gene Variants in Urban, Pasture, and Natural Habitats.** *Appl Environ Microbiol* 2013, **79**(5):1730-1734.
53. Nieto NC, Leonhard S, Foley JE, Lane RS: **Coinfection of western gray squirrel (*Sciurus griseus*) and other sciurid rodents with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Anaplasma phagocytophilum* in California.** *J Wildl Dis* 2010, **46**:291–296.

54. Silaghi C, Skuballa J, Thiel C, Pfister K, Petney T, Pfäffle M, Taraschewski H, Passos LM: **The European hedgehog (*Erinaceus europaeus*)—a suitable reservoir for variants of *Anaplasma phagocytophilum*?** *Ticks Tick Borne Dis* 2012, **3**:49–54.
55. Scharf W, Schauer S, Freyburger F, Petrovec M, Schaarschmidt-Kiener D, Liebisch G, Runge M, Ganter M, Kehl A, Dumler JS, Garcia-Perez AL, Jensen J, Fingerle V, Meli ML, Ensser A, Stuen S, von Loewenich FD: **Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum* ankA gene clusters.** *J Clin Microbiol* 2011, **49**:790–796.
56. von Loewenich FD, Baumgarten BU, Schröppel K, Geissdörfer W, Röllinghoff, M, Bogdan C: **High diversity of ankA sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**: 5033–5040.
57. Silaghi C, Kohn B, Chirek A, Thiel C, Nolte I, Liebisch G, Pfister K: **Investigations on the relationship of molecular and clinical findings of *Anaplasma phagocytophilum* involved in natural infections of dogs.** *J Clin Microbiol* 2011, **49**:4413–4414.
58. Földvári G, Jahfari S, Rigó K, Jablonszky M, Szekeres S, Majoros G, Tóth M, Molnár V, Coipan EC, Sprong H: ***Candidatus* Neoehrlichia mikurensis and *Anaplasma phagocytophilum* in Urban Hedgehogs.** *Emerg Infect Dis* 2014, **20**(3): 496-498.

Table 1 Number of questing *Ixodes ricinus* DNA samples available from earlier studies from 2009 to 2013 from site R1 and from 2011 and 2012 from site T

Number of DNA samples from <i>Ixodes ricinus</i> per developmental stage / sex									
Year	Site R1				Site T				Ticks investigated per year
	Females	Males	Nymphs	Larvae^d	Females	Males	Nymphs	Larvae^d	
2009 ^a	75	83	67	-	-	-	-	-	225
2010 ^a	60	60	60	-	-	-	-	-	180
2011 ^b	120	120	115	-	33	46	120	145	699
2012 ^b	115	120	120	-	109	117	120	80	781
2013 ^c	85	88	88	-	-	-	-	-	321
Total	455	471	450		141	174	300	225	2216

^aavailable from [36]

^bavailable from [24]

^cavailable from Gomez Chamorro(unpublished)

^dlarvae were investigated in pools of 5

Table 2 Number of additionally flagged questing *Ixodes ricinus* ticks collected at site T in the year 2013 together with the numbers of ticks selected for further investigation

Collecting month	Developmental stage/sex of collected <i>Ixodes ricinus</i> ticks				Total ticks per month
	Females	Males	Nymphs	Larvae	
	N ¹ (s) ²	N (s)	N (s)	N (s)	
April	19 (18)	36 (31)	418 (30)	1(0)	474 (79)
May	16 (16)	25 (25)	193 (30)	-	234 (71)
June	7 (7)	18 (18)	256 (30)	-	281 (55)
Total of ticks per stage	42 (41)	79 (74)	867 (90)	1(0)	989 (205)

¹Number of ticks collected

²Number of ticks selected for further investigation.

Table 3 Number, species and genders of small mammals trapped at all three study sites in 2012 and 2013

Rodent species	Number of captured rodents (f: females; m: males) per site		
	Site S	Site T	Site R1
<i>Apodemus agrarius</i>	4 (3 f; 1 m)	-	-
<i>Apodemus flavicollis</i>	79 (40 f; 39 m)	99 (53 f; 46 m)	-
<i>Apodemus sylvaticus</i>	-	-	36 (8 f; 28 m)
<i>Microtus agrestis</i>	1 (m)	-	-
<i>Microtus arvalis</i>	7 (4 f; 3 m)	-	-
<i>Mustela nivalis</i>	2 (m)	-	-
<i>Myodes glareolus</i>	257 (114 f; 143 m)	139 (75 f; 64 m)	-
<i>Sorex araneus</i>	1 (f)	-	-
<i>Sorex coronatus</i>	-	5 (3 f; 2 m)	-
<i>Talpa europaea</i>	1(m)	-	-
Total	352 (163 f; 189 m)	243 (131 f; 112 m)	36 (8 f; 28 m)

Table 4 Detection of *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (CNM) DNA in foetuses/neonates from gravid/postgravid rodents that were positive for DNA of CNM in their spleens

Rodent species	Location	Dams positive for CNM in spleen/blood samples	Dams with at least 1 positive foetus	Number of positive foetuses /all foetuses (%)
<i>Microtus arvalis</i>	S	1/1	1	4/6 (66.7)
<i>Microtus arvalis</i> ^s	S	1/-	-	0/5 (0)
<i>Myodes glareolus</i>	S	1/1	-	0/5 (0)
<i>Myodes glareolus</i>	S	1/1	1	3/5 (60)
<i>Myodes glareolus</i>	S	1/1	-	0/5 (0)
<i>Myodes glareolus</i>	S	1/1	-	0/4 (0)
<i>Myodes glareolus</i> ^s	S	1/-	-	0/5 (0)
<i>Myodes glareolus</i>	S	1/1	1	1/5 (20)
<i>Myodes glareolus</i>	S	1/1	1	5/5 (100)
<i>Myodes glareolus</i>	S	1/1	1	2/4 (50)
<i>Myodes glareolus</i>	S	1/1	1	4/4 (100)
<i>Myodes glareolus</i>	S	1/1	-	0/5 (0)
<i>Myodes glareolus</i>	S	1/1	1	3/4 ⁿ (75)
<i>Myodes glareolus</i>	T	1/1	1	3/4 (75)
<i>Apodemus flavicollis</i>	S	1/1	1	3/6 (50)
Total		15/13	9	23/67(32)

ⁿneonates; ^spositive in spleen only

Table 5 Attached ticks from captured rodents from all three sites from 2012 and 2013 and the number of CNM positives in a selected number of these ticks

Developmental stage/sex of ticks per species and per location								
Tick species	Site S			Site T		Site R1		Total of ticks per species
	Nymphs	Larvae	Adults *	Nymphs	Larvae	Nymphs	Larvae	
	N (p/n)	N (p/n)	N (p/n)	N (p/n)	N (p/n)	N (p/n)	N (p/n)	
<i>I. ricinus</i>	180 (14/73)	1740 (17/377)	-	44 (1/22)	1132 (0/352)	3 (0/3)	151 (0/91)	3250 (32/918)
<i>I. trianguliceps</i>	-	-	1 (0/1)	5 (0/5)	2 (0/1)	-	-	8 (0/7)
<i>D. reticulatus</i>	35 (0/15)	98 (1/25)	-	-	-	-	-	133 (1/40)
Total	2053 (32/490 ¹)			1184 (1/381 ²)		154 (0/94 ³)		3391 (33/965)

(p / n): Number of ticks positive from the total number of ticks we selected for further investigation/ number of selected ticks for DNA extraction and further investigation

*female ticks, ¹number of ticks selected from 77 rodents, ²number of ticks selected from 79 rodents

³number of ticks selected from 30 rodents

N: Number of ticks collected

Table 6 Prevalences of *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (CNM) in spleen samples from small mammals per site and year

Mammal species	Number of positive mammals for CNM (%)					
	Site S		Site T		Site R1	
	2012	2013	2012	2013	2012	2013
<i>Myodes glareolus</i>	86/229 (38%)	15/28 (54%)	21/131 (16%)	3/8 (37.5%)	-	-
<i>Apodemus sylvaticus</i>	-	-	-	-	1/22 (4.6%)	0/14 (0%)
<i>Apodemus agrarius</i>	0/4(0%)	-	-	-	-	-
<i>Apodemus flavicollis</i>	28/57 (49.1%)	11/22 (50%)	6/84 (7.1%)	5/15 (33.3%)	-	-
<i>Sorex spp.</i>	0/1 (0%)	-	0/1 (0%)	0/4 (0%)	-	-
<i>Mustela nivalis</i>	0/2 (0%)	-	-	-	-	-
<i>Talpa europaea</i>	0/1 (0%)	-	-	-	-	-
<i>Microtus arvalis</i>	4/7 (57.1%)	-	-	-	-	-
<i>Microtus agrestis</i>	1/1 (100%)	-	-	-	-	-
Total	119/302 (39%)	26/50 (52%)	27/216 (13%)	8/27 (30%)	1/22 (4.6%)	0/14 (0%)

2. Publikation 2

Molecular examinations of *Babesia microti* in rodents and rodent-attached ticks from urban and sylvatic habitats in Germany

Anna Obiegala^{1, 2}, Martin Pfeffer², Kurt Pfister¹, Carolin Karnath², Cornelia Silaghi^{1, 3}

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

²Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Leipzig,
Germany

³current affiliation: Institute of Parasitology, National Reference Center for Vector
Entomology, Vetsuisse Faculty, University of Zurich, Zurich, Switzerland

Ticks and Tick-Borne Diseases 2015, 6: 445-449 doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.03.005

Impact Factor: 2.88

Eingereicht: 07.01.2015

Akzeptiert: 04.03.2015

Veröffentlicht: 31.05.2015

Molecular examinations of *Babesia microti* in rodents and rodent-attached ticks from urban and sylvatic habitats in Germany

Anna Obiegala^{1,2}, Martin Pfeffer², Kurt Pfister¹, Carolin Karnath², Cornelia Silaghi^{1,3}

¹Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-Universität München, Leopoldstraße 5, 80802 Munich, Germany

²Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany

³Institute of Parasitology, National Reference Center for Vector Entomology, Vetsuisse Faculty, University of Zürich, Winterthurerstrasse 266a, 8057 Zurich, Switzerland

E-Mails: Pfeffer@vetmed.uni-leipzig.de; Kurt.Pfister@tropa.vetmed.uni-muenchen.de; Karnath@vetmed.uni-leipzig.de; Cornelia.Silaghi@uzh.ch

Correspondence:

Anna Obiegala
Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health
University of Leipzig
An den Tierkliniken 1
D-04103 Leipzig
Germany

Phone: +49 - 341 - 97 38 166

Fax: +49 - 341 - 97 38 198

E-mail: Anna.Obiegala@vetmed.uni-leipzig.de

Abstract

Small mammals serve as reservoir hosts for tick-borne pathogens, especially for those which are not transmitted transovarially in ticks - such as *Babesia microti*. Molecular investigations on the prevalence of *B. microti* in wild small mammals and on attached ticks from differently structured areas may provide information on the circulation of *B. microti* in different ecological niches. In 2012 and 2013, 622 rodents (396 *Myodes glareolus*, 178 *Apodemus flavicollis*, 36 *Apodemus sylvaticus*, 4 *Apodemus agrarius*, 7 *Microtus arvalis*, 1 *Microtus agrestis*) were captured from three differently structured habitats (urban, sylvatic, recultivated) in Germany. Attached ticks were collected from 449 small mammals (3250 *Ixodes ricinus*, 7 *Ixodes trianguliceps*, 133 *Dermacentor reticulatus*). A representative selection of a maximum of 5 ticks per developmental stage and species per 30 rodents of each species, location and year resulting in 965 ticks was further investigated. DNA was extracted from tick, blood and spleen samples, and tested by PCR for the partial *18S rRNA* gene of *B. microti* with subsequent sequencing. The prevalence was significantly higher in rodents from the sylvatic site (4.6%) than in rodents captured at both other sites (0-0.6%) ($\chi^2= 11.95$; $p= 0.00125$). Body and spleen weight of infected *M. glareolus* from the sylvatic site were significantly higher compared to those from non-infected individuals from that site ($p=0.00288$ and $p=0.00017$, respectively). *Babesia microti* DNA was detected in 3 out of 965 attached ticks (0.3%; 95%CI: 0-1) from all sites, but they derived exclusively from rodents captured at the sylvatic site. At the same site, *I. ricinus* nymphs (7.7%; 95%CI: 1-25.3) were significantly more often infected than *I. ricinus* larvae (0%; 95%CI: 0-1.3) ($\chi^2=26.72$; $p < 0.0001$). The majority of positive rodents was also found at that site. *I. trianguliceps* occurred exclusively and the majority of *M. glareolus* at that site. Thus, it may be assumed that the circulation of *B. microti* is more efficient where this tick species and voles exist sympatrically than in areas with a predominant occurrence of *Apodemus* species.

Keywords

Tick-borne pathogen; *Babesia microti*; *Ixodes ricinus*; *Ixodes trianguliceps*; Rodent.

Introduction

Small mammals serve as hosts for ixodid ticks. Microtine voles have been discussed as reservoir hosts for the intraerythrocytic protozoan *Babesia microti* (phylum Apicomplexa, order Piroplasmida) [Gray et al. 2002]. It was first described in a vole near Lisbon in 1910 as *Smithia microtia* (*Microtus incertus*, now *Microtus arvalis* subspecies *incertus*, the common

vole [Walter 1981]. *Babesia microti* has since been detected in small mammals, humans and hard ticks from Europe and the USA [Kogut et al. 2005, Hildebrandt et al. 2007, Silaghi et al. 2012, Hersh et al. 2012]. Human babesiosis caused by *B. microti* displays subclinical to fatal malaria-like symptoms. It primarily occurs in the USA [Vannier and Krause 2012]. In Europe however, severe cases of human babesiosis have mainly been caused by *Babesia divergens*-like parasites in immunocompromised patients, but cases have also been reported in immunocompetent patients [Hildebrandt et al. 2013, Mathis et al. 2006, Martinot et al. 2011]. Transplacental transmission and transmission via tick bites have been described before [Vannier and Krause 2009]. However the first and so far only autochthonous human case caused by *B. microti* in Europe was transmitted by blood transfusion [Hildebrandt et al. 2007]. While transovarial transmission in ticks was confirmed for *B. divergens* and other *Babesia* species, experimentations have failed to demonstrate transovarial transmission for *B. microti* [Gray et al. 2010]. Therefore mammalian hosts are essential for its maintenance in natural transmission cycles [Gray et al. 2002]. As information on the enzootic life cycle of *B. microti* is still incomplete, the objectives of this study were to detect and compare *B. microti* prevalences in wild rodents and attached ticks as well as to assess their role in the circulation of this protozoan at ecologically different habitats in Germany.

Material and Methods

Collection of wildlife samples

In 2012 and 2013 small mammals were captured at three differently structured sites in Germany. The urban site “R” (7.4 ha, 49°00'55.72''N, 12°05'08.89''E) is a small park near the city centre of Regensburg. It is surrounded by walls and high traffic roads. The park is highly frequented by visitors. Large wild animals are absent. Sylvatic site “T” (641 ha, 48°06'36.42''N, 10°34'33.40''E), located near Tussenhausen in Bavaria, is a large forest area (641 ha). This mixed forest is dominated by beeches, oaks and spruces. Different wild animal species are present and the anthropogenic influence is low. Forestry is not cultivated extensively. Therefore, there is little to no interaction between wild and domestic animals and humans [Forstdirektion Oberbayern]. The recultivated site “S” is subdivided in three locations (51°15'32.2"N, 12°21'02.5"E, 51°17'01.3"N, 12°21'00.6"E, 51°26'97.2"N, 12°32'25.6"E), formerly described as site E-G, which surround an artificially created lake “Lake Cospuden”, near Leipzig, Saxony [Silaghi et al., 2012]. The lake belongs to a recultivated area, which was created out of a former brown coal mining area. Today, the surroundings of this lake are of public health interest as it is the largest recreational area near Leipzig

(<http://www.leipzigerneuseenland.de/>). Bushes and trees less than 20 years old characterize this site. Nevertheless a high diversity of large and small wild mammals is present. Details of the investigated sites have been described previously [Silaghi et al. 2012, Obiegala et al. 2014, Overzier et al. 2013]. Small mammals were trapped using Sherman® live animal traps (H. B. Sherman Traps, Inc., Tallahassee, Fla. U.S.A.) (official permit Site R1: 55.1-8646.4-140, Site T: 55.1-8646-2/30, Site S: AZ 36.11-36.45.12/4/12-001). Traps, baited with apple slices, were placed for at least two consecutive nights per month and site and were checked twice a day. Collected animals were anaesthetized with CO₂ and then euthanized by cervical dislocation. Blood was taken by heart puncture. Animals were sexed, weighed and necropsy was performed to obtain spleen samples. All small mammals were identified by the use of taxonomic keys [Stresemann 1989]. Further, a conventional PCR targeting the *cytochrome b* gene [Parson et al. 2000] yielding an amplicon of 354 base pairs was performed to verify morphological identification for a randomly selected number of 69 individuals as described [Obiegala et al. 2014].

DNA Extraction and PCR analysis

DNA was extracted from ticks, blood and spleen samples from small mammals with the Maxwell® 16 LEV blood DNA kit (Promega GmbH, Mannheim, Germany) and the corresponding Maxwell® 16 System (Promega GmbH) as described [Obiegala et al. 2014]. PCR amplification of an *18S rRNA Babesia* gene fragment (411-452 bp) was performed using a previously published PCR protocol [Casati et al. 2006] with modifications as described [Schorn et al. 2011]. Amplicons were detected by agarose gel electrophoresis and purified with the Qiaquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) for sequencing at Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany. Sequencing was performed with forward and reverse primers used for PCR amplification. Sequences were analysed with the Chromas Lite program (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia) and aligned to available sequences in the GenBank with BLASTn (National Center for Biotechnology Information, Bethesda MD, USA) [Schorn et al. 2011].

Statistical analysis

Graph Pad Software (Graph Pad Software, Inc., San Diego, Ca., USA) was used for the calculation of confidence intervals (CI 95%) of prevalence rates with the Clopper and Pearson method. Pearson's chi-squared test with a type I error α of 0.05 and Fisher's exact test for the comparison of sample sizes < 5 were used to compare *B. microti* prevalences. Comparisons of multiple values were adjusted with the Bonferroni correction. To compare body and spleen

weight of infected and non-infected *M. glareolus* at the sylvatic site the one-tailed Wilcoxon-Mann-Whitney-Test with $\alpha=2.5$ was used. Results with p values <0.05 were considered to be positive.

Results

Collection of wildlife samples

Altogether 622 rodents of six species (4 *Apodemus agrarius*, 36 *A. sylvaticus*, 178 *A. flavicollis*, 7 *Microtus arvalis*, 1 *Mi. agrestis*, 396 *M. glareolus*) were collected. From these animals 443 blood and 585 spleen samples were available for further examination (Table 1). Altogether 3,391 ticks of three species (7 *Ixodes trianguliceps*, 3,250 *I. ricinus*, 133 *Dermacentor reticulatus*) were collected from 449 of the 622 small mammals. Altogether 92.1% of all collected ticks were larvae. Nymphs were exclusively collected from *M. glareolus* and *A. flavicollis*. Tick infestation rates ranged from 1 to 112 ticks with a mean infestation of 8 ticks and a median infestation of 16 ticks per small mammal. For *M. glareolus* the mean infestation rate was 4 ticks and the median infestation was 6 ticks. The mean infestation on *A. flavicollis* was 10 ticks per mouse and the median infestation was 23 per mouse. For *A. sylvaticus* the mean infestation rate was 4 ticks and the median infestation was 9. *I. trianguliceps* ticks were found on *M. glareolus* and *A. flavicollis* exclusively in the sylvatic site T. A total of 98.5% of all *D. reticulatus* ticks were collected from *M. glareolus* and only 1.5% from *A. flavicollis*. All *D. reticulatus* were found at the recultivated site S. According to the availability of different rodent and tick species, 5 ticks per tick stage and species of 30 individuals of each rodent species were selected per year and site. This resulted in 965 ticks from 186 rodents for further analysis (Table 2).

Babesia spp. detection and sequence analysis

In total 13 out of 622 (2.1%; 95%CI: 1.2-3.6) small mammals were positive for *B. microti*. Of those, 11 rodents were from site T (4.6%; 95%CI: 2.5-8.2), two from site S (0.6%; 95%CI: 0-2.2) and none from site R1 (Table 1). The prevalence for *B. microti* was significantly higher at site T than at site R1 and site S ($\chi^2=11.95$; $p=0.00125$). At site T, *M. glareolus* (7.2%; 95%CI: 3.8-12.9) were significantly more often infected than *A. flavicollis* (1%; 95%CI: 0-6) ($\chi^2=5.03$; $p=0.025$). Body and spleen weight was significantly higher in infected ($n_1=10$) than in non-infected *M. glareolus* ($n_2=229$) from site T (U=976; $p=0.00288$; respectively for the spleen weight: U=1084.5; $p<0.001$) (Figure 1). The ratio between body and spleen weight was 242:1 for non-infected and 48:1 for infected *M. glareolus*. The infestation rate of ticks on

infected rodents ranged from 0 to 29. Altogether, 3 out of 965 (0.3%; 95%CI: 0-1) attached ticks were positive for *B. microti* (Table 2). These ticks originated from site T (0.79%; 95%CI: 0.2-2.4) (2 *I. ricinus* nymphs, 1 *I. trianguliceps* nymph) and two of them (1 *I. ricinus*, 1 *I. trianguliceps*) were collected from *B. microti*-positive rodents (Table 2). All nymphs (n=2) collected from infected rodents were positive for *B. microti* however none of the larvae collected from infected rodents was positive (n=89). *Dermacentor reticulatus* ticks, regardless whether larvae or nymphs, (0%; 95%CI: 0-10.4) were negative for *B. microti*. Altogether, 16 *B. microti* sequences were obtained from 13 rodents, as 3 of those were positive in both blood and spleen. Three sequences were obtained from rodent-attached ticks. All sequences were 100% identical to short sequences of the pathogenic *B. microti* Jena/Germany genotype (GenBank accession no. JQ880658.1, JX6273569.1). This does not mean that the sequenced parasites from this study are necessarily pathogenic. Obtained sequences were deposited in GenBank under the following accession numbers: KP055632-KP055650.

Discussion

The prevalence of *B. microti* in small mammals from Slovenia, Great Britain, Poland and Germany ranged between 1.6% and 42% [Duh et al. 2003, Bown et al. 2008, Karbowiak 2004, Pawelczyk et al. 2004, Silaghi et al. 2012]. Our findings are in line with the lower range of these previous observations (2.1%). In *Mi. agrestis*, a former study showed a prevalence of *B. microti* infection (9 %) comparable to our findings for this rodent species (14.3%) [Pawelczyk et al. 2004]. *Mi. agrestis* and *M. glareolus* (family Cricetidae) have been discussed as main reservoirs for *B. microti* [Bown et al. 2008]. Splenomegaly and a related higher body weight were observed for *B. microti*-infected *M. glareolus* compared to non-infected ones at site T. This result may be explained by the *B. microti* infection which causes splenomegaly in small mammals [Welc-Falęciak et al. 2007]. Whereas in 2011 respectively in 2003 Beck et al. and Duh et al. found *A. flavicollis* positive for *B. microti* in a high percentage (11.8-16.2%), the prevalence for this rodent species was very low in our study (0.01%). Furthermore, other *Apodemus* species such as *Apodemus sylvaticus* and *A. agrarius* were negative for *B. microti* in those previous studies [Beck et al. 2011, Duh et al. 2003]. This is in line with our findings in these two species and supports the hypothesis that mice of the species *A. agrarius* and *A. sylvaticus* are subordinately involved in the natural life cycle of *B. microti*. Additionally, *I. trianguliceps* ticks, adapted to voles [Bown et al. 2008] and present at sylvatic areas [Bown et al. 2003], have been pointed out as the main vector for *B. microti* among rodents and shrews [Nefedova et al. 2013, Randolph 1995]. Significantly more positive rodents were found at the sylvatic site T than at the recultivated (S) and urban site

(R1). In this context, one out of seven *I. trianguliceps* ticks originating exclusively from the sylvatic site, where also the majority of positive voles was found, was positive for *B. microti*. The prevalence rates in *I. ricinus* ticks from the present study are comparable to the lower prevalence (0.003-10.1%) from other European countries such as Slovenia, the Netherlands, France, Belgium and Switzerland [Foppa et al. 2002, Lempereur et al. 2011, Bonnet et al. 2014, Duh et al. 2001, Wielinga et al. 2009]. All three positive ticks (nymphs) were attached to rodents captured at the sylvatic site T. No transovarial transmission for *B. microti* in ticks was described before which may explain that none of the 846 analysed larvae, regardless of the tick species, was positive [Homer et al. 2000]. At site T, two out of three *B. microti*-positive nymphs (1 *I. ricinus*, 1 *I. trianguliceps*) derived from *B. microti*-positive rodents. This result underlines particularly the potential reservoir role of *M. glareolus* for *B. microti* in sylvatic habitats. However none of 89 larvae deriving from positive rodents was positive for *B. microti*. The infection rates of fully engorged larvae deriving from infected rodents, is higher than of larvae which are less engorged [Homer et al. 2000]. None of the larvae in this study detached naturally which could be an explanation for this result. Moreover, 5 rodents were solely positive in spleen and not in blood. According to our results and to those from former studies [Wójcik-Fatla et al. 2012], *I. ricinus* may serve as a bridge vector [Silaghi et al. 2012; Overzier et al. 2013]. On the contrary, we cannot confirm that *D. reticulatus* ticks may serve as bridge vectors for *B. microti* even though its role has also been discussed before [Wójcik-Fatla et al. 2012]. The sequences obtained from both ticks and rodents all showed a 100% identity to each other and to sequences deposited under following GenBank accession no.: JQ880658.1, JX6273569.1. This sequence belongs to the pathogenic *B. microti* Jena/Germany genotype which was published in the context of the first autochthonous human babesiosis case in Europe [Hildebrandt et al. 2007]. The existence of reservoir hosts and bridge vector ticks infected with this particular strain may constitute a risk to human health at the investigated sylvatic site, even though only one human case has been reported in Europe thus far.

The life cycle of *B. microti* seems adapted to an environment with sympatric existence of voles and *I. trianguliceps* ticks. Besides, according to our results, *Apodemus* species seem of secondary importance in the transmission of *B. microti*.

Acknowledgment

Authors wish to thank Claudia Thiel, Tim Tiedemann and Sarah Wagner for excellent technical assistance. Furthermore, the authors thank Anneliese Balling, Dietlinde Woll, Uwe

Birett, Rayan Ababneh, Jennifer Krieg, Daniela Sum, Tessa Foerster, Franziska Eller and Claudia Kehler for their help in rodent trapping and necropsies, as well as Alexander Mathis for comments on the manuscript. This study was partially funded by EU grant FP7-261504 EDENext and is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext 281 (<http://www.edenext.eu/>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission. A part of the study was performed on behalf of the Federal Environment Agency of Germany within the UFOPLAN (FKZ 371148402) and financed by the Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation, Building and Nuclear Safety. The work of AO, MP, CS and KP was done under the frame of EurNegVec COST Action TD1303.

References

- Beck, R., Vojta, L., Ćurković, S., Mrljak, V., Margaletić, J., Habrun B., 2011. Molecular Survey of *Babesia microti* in Wild Rodents in Central Croatia. *Vector. Borne. Zoonotic. Dis.* 11, 81-83.
- Bonnet, S., Michelet, L., Moutailler, S., Cheva, J., Hébert, C., Vayssier-Taussat, M., Eloit, M., 2014. Identification of parasitic communities within European ticks using next-generation sequencing. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 8, e2753.
- 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., Telford, G.R., Ogden, N.H., Telfer, S., Woldehiwet, Z., Birtles, R.J., 2008. Relative importance of *Ixodes ricinus* and *Ixodes trianguliceps* as vectors for *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in field vole (*Microtus agrestis*) populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7118-7125.
- 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.
- Duh, D., Petrovec, M., Avsic-Županc, T., 2001. Diversity of *Babesia* Infecting European sheep ticks (*Ixodes ricinus*). *J. Clin. Microbiol.* 39, 3395-7.
- Duh, D., Petrovec, M., Trilar, T., Avsic-Županc, T., 2003. The molecular evidence of

Babesia microti infection in small mammals collected in Slovenia. Parasitology 126, 113-117.

Foppa, I.M., Krause, P.J., 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, 722-6.

Forstdirektion Oberbayern-Schwaben: Managementplan zum FFH-Gebiet 7829-301 "Angelberger Forst", 2004.

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.

Hersh, M.H., Tibbetts, M., Strauss, M., Ostfeld, R.S., Keesing, F., 2012. Reservoir Competence of Wildlife Host Species for *Babesia microti*. Emerg. Infect. Dis. 18, 1951-1957.

Hildebrandt, A., Hunfeld, K.P., Baier, M., Krumbholz, A., Sachse, S., Lorenzen, T., Kiehntopf, M., Fricke, H.J., Straube, E., 2007. First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 26, 595-601.

Hildebrandt, A., Gray, J.S., Hunfeld, K.P., 2013. Human babesiosis in Europe: what clinicals need to know. Infection. 41, 1057-72.

Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S.R., 3rd., Krause, P.J., Persing, D.H., 2000. Babesiosis. Clin. Microbiol. Rev. 13, 451-69.

Karbowiak, G., 2004. Zoonotic reservoir of *Babesia microti* in Poland. Pol. J. Microbiol. 53, 61-5.

Kjemtrup, A.M., Conrad, P.A., 2000. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. Int. J. Parasitol. 30, 1323-37.

Kjemtrup, A. M., Lee B., Fritz C. L., Evans C., Chervenak M., Conrad P. A., 2002. Investigation of transfusion transmission of a WA1-type babesial parasite to a premature infant in California. 42, 1482-87.

Kogut, S.J., Thill, C.D., Prusinski, M.A., Lee, J.H., Backerson, P.B., Coleman, J.L., Anand, M., White, D.J., 2005. *Babesia microti*, Upstate New York. Emerg. Infect. Dis.

11, 476–478.

Leiby, D. A., Chung, A.P.S., Cable, R. G., Trouern-Trend, J., McCullough, J., Homer, M., J., Reynolds, L. D., Houghton, R.L., Lodes M. J., Persing, D.H., 2002. Relationship between tick bites and the seroprevalence of *Babesia microti* and *Anaplasma phagocytophila* (previously Ehrlichia sp.) in blood donors. *Transfusion* 42, 1585-1591.

Lempereur, L., De Cat, A., Caron, Y., Madder, M., Claerebout, E., Saegerman, C., Losson, B., 2011. First molecular evidence of potentially zoonotic *Babesia microti* and *Babesia* sp. EU1 in *Ixodes ricinus* ticks in Belgium. *Vector. Borne. Zoonotic. Dis.* 11, 125-30.

Martinot, M., M. M. Zadeh, Y. Hansmann, I. Grawey, D. Christmann, S. Aguilon, M. Jouglin, A. Chauvin, and D. De Briel. 2011. Babesiosis in immunocompetent patients, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 114-116.

Mathis, A., Hilpertshauer, H., Deplazes, P., 2006. Piroplasms of ruminants in Switzerland and zoonotic significance of *Babesia*. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 148, 151-9.

Nefedova, V.V., Korenberg, E., Kovalevski, Yu. V., Samokhvalov, M. V., Gorelova, N.B., 2013. The role of *Ixodes trianguliceps* tick larvae in circulation of *Babesia microti* in the Middle Urals. *Entomol. Rev.* 93, 258-266.

Obiegala, A., Pfeffer, M., Pfister, K., Tiedemann, T., Thiel, C., Balling, A., Karnath, C., Woll, D., Silaghi, C., 2014. *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis and *Anaplasma phagocytophilum*: prevalences and investigations on a new transmission path in small mammals and ixodid ticks. *Parasit. Vectors.* 12, 563.

Overzier, E., Pfister, K., Thiel, C., Herb, I., Mahling, M., Silaghi, C., 2013. Diversity of *Babesia* and *Rickettsia* Species in questing *Ixodes ricinus*: A longitudinal study in urban, pasture and natural habitats. *Vector. Borne. Zoonotic. Dis.* 13, 559-564.

Parson, W., Pegoraro, K., Niederstätter, H., Föger, M., Steinlechner, M., 2000. Species identification by means of the cytochrome b gene. *Int. J. Legal. Med.* 114, 23–28.

Pawelczyk, A., Bajer, A., Behnke, J.M., Gilbert, F.S., Siński, E., 2004. Factors affecting the component community structure of haemoparasites in common voles (*Microtus arvalis*) from the Mazury Lake district region in Poland. *Parasitol. Res.* 92, 270-84.

Randolph, S.E., 1995. Quantifying parameters in the transmission of *Babesia microti* by

the tick *Ixodes trianguliceps* amongst voles (*Clethrionomys glareolus*). *Parasitology* 110, 287-95.

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

Silaghi, C., Woll, D., Hamel, D., Pfister, K., Mahling, M., Pfeffer, M., 2012. *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks, ticks parasitizing rodents and the parasitized rodents – Analyzing the host pathogen-vector interface in a metropolitan area. *Parasit. Vectors*. 5, 191.

Stresemann, E., 1989. Exkursionsfauna von Deutschland, Wirbeltiere, Volume 3. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer.

Vannier, E., Krause, P. J., 2009. Update on Babesiosis. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2009, Article ID 98456.

Vannier, E., Krause, P. J., 2012. Human babesiosis. *N. Engl. J. Med.* 366, 2397-2407.

Walter, G., 1981. Isolierung von *Babesia microti* (Franca 1912) aus freilebenden Nymphen von *Ixodes ricinus* (Linnaeus 1758). *Acta Tropica* 38, 187-188.

Welc-Faleciak, R., Bajer, A., Bednarska, M., Paziewska, A., Siński, E., 2007. Long term monitoring of *Babesia microti* infection in BALB/c mice using nested PCR. *Ann. Agric. Environ. Med.* 14, 287-290.

Wielinga, P.R., Fonville, M., Sprong, H., 2009. Persistent detection of *Babesia* EU1 and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* in the Netherlands during a 5-year surveillance: 2003-2007. *Vector. Borne. Zoonotic. Dis.* 9, 119-22.

Wójcik-Fatla, A., Bartosik, K., Buczek A., Dutkiewicz J., 2012. *Babesia microti* in adult *Dermacentor reticulatus* ticks from Eastern Poland. *Vector. Borne. Zoonotic. Dis.* 12, 841-843.

Table 1 Prevalences of *Babesia microti* in spleen and/or blood samples from small

mammals per site and year, detected by PCR

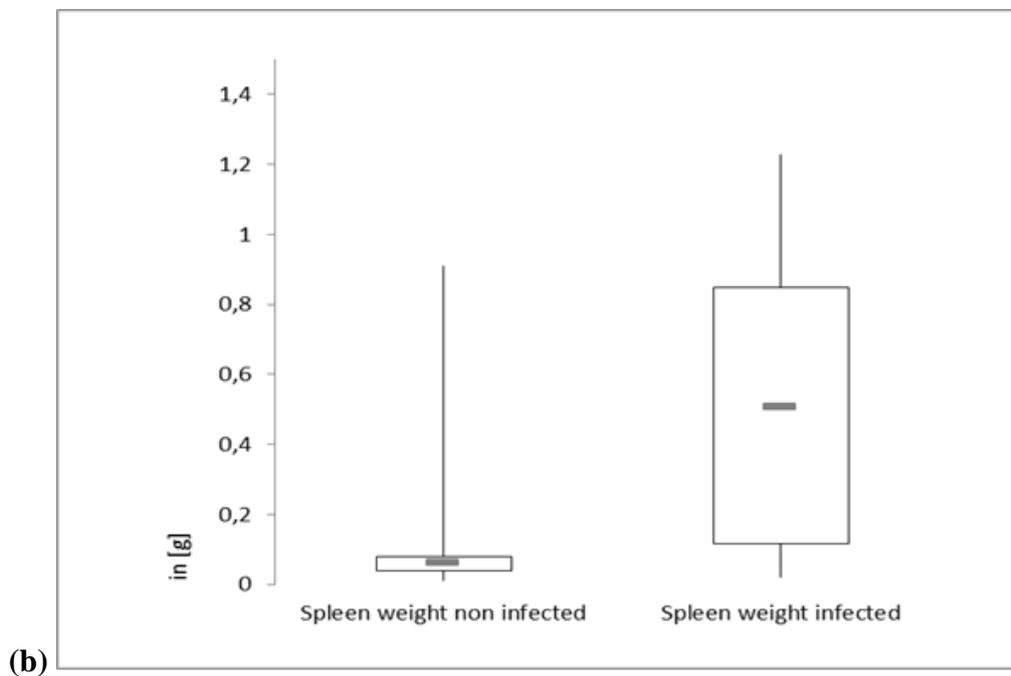
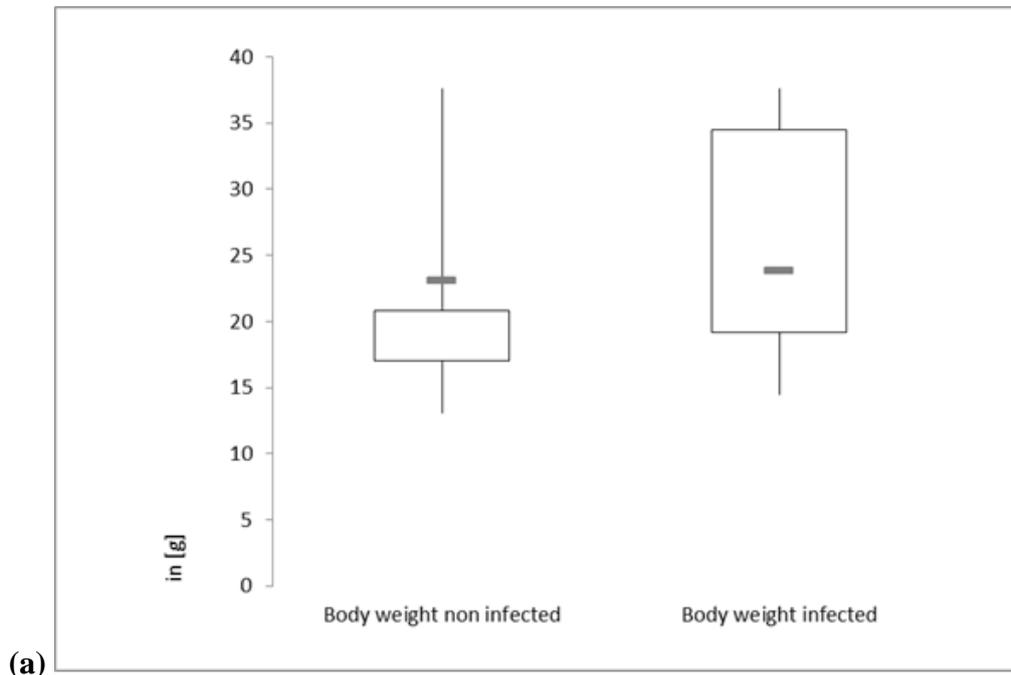
Mammal Species	Number of mammals positive for <i>Babesia microti</i> (%)						Total
	Site S		Site T		Site R1		
	2012	2013	2012	2013	2012	2013	
<i>Myodes glareolus</i>	1/229 (0.004)	0/28 (0)	7/131 (5.3)	3/8 (37.5)	-	-	11/396 (0.03)
<i>Apodemus sylvaticus</i>	-	-	-	-	0/22 (0)	0/14 (0)	0/36 (0)
<i>Apodemus agrarius</i>	0/4 (0)	-	-	-	-	-	0/4 (0)
<i>Apodemus flavicollis</i>	0/57 (0)	0/22 (0)	1/84 (1.2)	0/15 (0)	-	-	1/ 178 (0.01)
<i>Microtus arvalis</i>	1/7 (14.3)	-	-	-	-	-	1/7 (14.3)
<i>Microtus agrestis</i>	0/1 (0)	-	-	-	-	-	0/1 (0)
Total	2/298 (0.01)	0/50 (0)	8/215 (3.7)	3/23 (13.4)	0/22 (0)	0/14 (0)	13/622 (0.02)
	2/348 (0.6)		11/238 (4.6)*		0/36 (0%)		

*statistically significantly higher value ($\chi^2=12.1398$; $p=0.0005$) compared to the other sites in combined years 2012 and 2013, tested by the Chi-square test ($\alpha=0.05$) and the Bonferroni correction for multiple values

Table 2 Developmental stage and sex of attached ticks per species and per location collected from small mammals captured in 2012 and 2013 from three sites S¹, T², R1³, and number of *B. microti* positive ticks in a selected number of investigated ticks.

Tick species	Number of collected ticks (number of <i>B. microti</i> positive ticks/number of investigated ticks)										Total ticks per species
	Site S ¹		Site T ²		Site R1 ³						
	Nymphs	Larvae	Adult ^c	Nymphs	Larvae	Nymphs	Larvae	Nymphs	Larvae		
<i>I. ricinus</i>	180 (0/73)	1740 (0/377)	-	44 (2*/22)	1132 (0/352)	3 (0/3)	151 (0/91)				3250 (2/918)
<i>I. trianguliceps</i>	-	-	1 (0/1)	5 (1**/5)	2 (0/1)	-	-				8 (1/7)
<i>D. reticulatus</i>	35 (0/15)	98 (0/25)	-	-	-	-	-				133 (0/40)
Total	2053 (0/490^d)			1184 (3/381^e)		154 (0/94^f)					3391 (3/965)

¹recultivated site; ²sylvatic site; ³ urban site, ^cfemale tick from site T; ^dnumber of ticks selected from 77 rodents; ^enumber of ticks selected from 79 rodents; ^fnumber of ticks selected from 30 rodents, *one of those was collected from an infected *Myodes*

Figure 1

Box plots of body (a) and spleen weights (b) from *Myodes glareolus* from site T, which were PCR negative (n=129; number of females= 71; number of males=58) or positive (n=10; number of females=4; number of males=6) for *Babesia microti*.

V. DISKUSSION

In dieser Studie wurden Kleinsäuger an drei Standorten mit unterschiedlicher Habitatstruktur gefangen und diese, wie auch deren Zecken, auf Zecken-übertragene Pathogene (CNM, *A. phagocytophilum*, *B. microti*) untersucht. So wurden ein kleiner Stadtpark in Regensburg, ein großer Wald im Unterallgäu und ein renaturiertes Braunkohleabbaugebiet untersucht, welches nicht in Bayern sondern in Sachsen liegt. Die Standorte unterschieden sich in Bezug auf ihre Größe, ihre Höhen- und geografische Lage, sowie das vorherrschende Klima.

Insgesamt wurden in dieser Studie zehn Mäusearten gefangen, wobei die größte Artenvielfalt wie auch die größte Anzahl an gefangenen Individuen am renaturierten Standort vorzufinden war. Im Gegensatz dazu wurden nur wenige Individuen einer einzigen Art am urbanen Standort gefangen. Die große Artenvielfalt am renaturierten Standort lässt sich durch das erst vor ca. 20 Jahren neuentstandene Habitat erklären, das durch sein neues Gefüge noch keine festen Nischen für die jeweiligen Arten zulässt (Ricklefs, 1987). Die geringe Fangrate im Stadtpark lässt sich durch dessen kleine Größe erklären.

Die vorherrschende Zeckenspezies *I. ricinus* wurde an allen drei Standorten detektiert und die meisten Zecken pro Individuum waren am renaturierten Standort zu finden. *Ixodes trianguliceps* Zecken wurden nur am Waldstandort nachgewiesen, was typisch für das Habitat dieser Zecken ist, da diese vornehmlich an silvatischen Standorten anzutreffen sind (Bown et al., 2003). Ausschließlich am renaturierten Standort konnten *D. reticulatus* Zecken gefunden werden, was auf die Lage und die Beschaffenheit des Standortes zurückzuführen ist, da dieser Standort durch feuchte Böden, die Nähe zum Cospudener See und durch eine niedrige Höhenlage ausgezeichnet ist (Küchler und Harnapp, 2004). Aktuelle Studien zufolge ist das Vorhandensein von feuchten Böden und die Nähe zu Gewässern von großer Bedeutung für das Vorhandensein von *D. reticulatus* Zecken (Heile et al., 2006; Weis, 2014). Im Gegensatz dazu wird das Vorkommen von *D. reticulatus* Zecken an Standorten mit der Abwesenheit von Gewässern nicht primär vermutet (Weis, 2014), was erklären würde, warum diese Zeckenspezies nicht an den beiden anderen Standorten vorzufinden war.

In den letzten Jahren wurde CNM immer häufiger nicht nur im Zusammenhang mit humanen Fällen sondern auch in unterschiedlichen Kleinsäugerarten aus Deutschland (0,0-100 %), den Niederlanden (0,0-24,8 %), Italien (2,9 %), Frankreich (1,8 %), Schweden (0,0-10,0 %) und der Schweiz (3,9 %) nachgewiesen (Andersson und Råberg, 2011; Beninati et al., 2006; Burri et al., 2014; Jahfari et al., 2012; Krücken et al., 2013; Vayssier-Taussat et al., 2012). Eine

vorangegangene Studie unserer Arbeitsgruppe zeigte hohe Prävalenzen (33,0-65,0 %) einer relativ kleinen Untersuchungsgruppe aus den Jahren 2010 und 2011 am renaturierten Standort (Silaghi et al., 2012c). In der vorliegenden Studie wurde eine größere Stichprobenanzahl an Nagern und gesogenen Zecken aus den nachfolgenden Jahren beprobt. Die gefundenen Prävalenzen waren in der vorliegenden Studie vergleichbar (2,8-100 %) bzw. teilweise sogar höher als in den oben genannten vorangegangenen Studien. In der vorliegenden Studie waren fünf der zehn untersuchten Kleinsäugerarten positiv für CNM (*M. arvalis*, *M. agrestis*, *Ap. flavicollis*, *Ap. sylvaticus*, *My. glareolus*). *Apodemus sylvaticus* war in der vorliegenden Studie zu einer signifikant niedrigeren Prävalenz befallen als *Ap. flavicollis* und *My. glareolus*. In anderen Studien wurden für *Ap. sylvaticus* ebenfalls geringe Prävalenzen berichtet (0,0-11,0 %) (Burri et al., 2014; Krücken et al., 2013). Jedoch gab es ebenfalls eine Studie aus den Niederlanden, wo eben diese Mäuseart vergleichsweise hohe Prävalenzen für CNM zeigte (21,7 %) (Jahfari et al., 2012). Obwohl in der vorliegenden Studie nur wenige Feldmäuse (*M. arvalis* und *M. agrestis*) gefangen und untersucht wurden, zeigten sie sehr hohe Prävalenzen (57,0-100 %). In früheren Studien wurden ebenfalls hohe Prävalenzen in *Microtus* spp. beschrieben (25,0-100 %) (Jahfari et al., 2012; Krücken et al., 2013). Da es in der vorliegenden wie auch in vergangenen Studien relativ hohe Prävalenzen für CNM in unterschiedlichen Kleinsäugerarten gab, ist davon auszugehen, dass für CNM keine Reservoirpräferenz vorliegt und allen genannten Nager-Arten eine Rolle als potentielle Reservoirwirte zugeschrieben werden kann. Am urbanen Standort kamen nur Kleinsäuger der Art *Ap. sylvaticus* vor. Die CNM-Prävalenz in diesen Mäusen war im Vergleich zu Prävalenzen in wirtssuchenden Zecken vom selben Standort gering. Wiederum ist die Zeckendichte im Vergleich zum Vorkommen von Kleinnagern an diesem Standort sehr hoch (Overzier et al., 2013a). Dies lässt vermuten, dass es an diesem Standort andere Reservoirwirte als *Ap. sylvaticus* geben muss. Földvári et al. beschrieben ein relativ hohes Vorkommen von CNM in Igel (2,8 %) (Földvári et al., 2014). Das Vorkommen von Igel und einer großen Anzahl verschiedener Vogelarten ist an diesem Standort bekannt (Stadt Regensburg). Igel könnte somit an diesem Standort eine Rolle als potentieller Reservoirwirt zukommen. Spitzmäuse hingegen waren CNM-negativ, womit sie, wie schon in früheren Studien vermutet, wohl kein potentielles Reservoir darstellen (Jahfari et al., 2012; Silaghi et al., 2012c). In der vorliegenden Studie waren Nager am renaturierten Standort signifikant häufiger befallen als Nager an den beiden anderen Standorten. In diesem Zusammenhang ist das erst kürzlich entstandene Habitat an diesem Standort zu nennen, was eine mögliche

Erklärung für die sehr hohen Prävalenzen ist. Männliche Rötelmäuse waren doppelt so häufig mit CNM befallen wie weibliche. Ein ähnliches Ergebnis wurde in einer früheren Studie für das Puumala Virus, das zu den Hantaviren gehört, in Rötelmäusen beschrieben (Olsson et al., 2002). Dieses Phänomen wurde durch die höhere Aktivität und einen größeren Aktionsradius von Männchen im Vergleich zu Weibchen erklärt, was auch eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse der vorliegenden Studie ist (Mills et al., 1999; Olsson et al., 2002). In einer früheren Studie wurde beschrieben, dass juvenile Rötelmäuse kein Reservoir für CNM darstellen. Stattdessen wurde die Funktion von *I. ricinus* Zecken als Vektor bekräftigt (Andersson et al., 2013). In der vorliegenden Studie waren neugeborene Rötelmäuse eines positiven Muttertiers und 60,0 % der Föten von positiven Muttertieren positiv für CNM. Muttertiere mit positiven Föten gehörten drei verschiedenen Arten an (*Ap. flavicollis*, *My. glareolus*, *M. agrestis*). Die Ergebnisse lassen auf eine diaplazentare Übertragung in diesen Kleinsäugerarten schließen. Dies ist insofern plausibel, da Mäuse um das zehnfache häufiger infiziert waren als gesogene und wirtssuchende Zecken. Des Weiteren ist bisher keine transovarielle Übertragung in Zecken beschrieben worden. Eine Übertragung innerhalb einer Mäusepopulation wäre durch die wahrscheinliche diaplazentare Übertragung in Nagern ohne Zecken möglich und würde die höheren Prävalenzen in Kleinnagern im Vergleich zu den geringen Prävalenzen in Zecken erklären. Es gibt in dieser aktuellen Studie außerdem keinen Hinweis auf eine transovarielle Übertragung in Zecken, da alle wirtssuchenden Larven negativ waren. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass Zecken CNM auf Fehlwirte, wie den Menschen, übertragen können. Zudem sei zu erwähnen, dass positive gesaugte Zecken von positiven Nagern stammten, was durch eine Übertragung von Nagern auf Zecken durch infiziertes Blut zu erklären wäre. *Ixodes ricinus* Nymphen waren signifikant häufiger infiziert als Larven, was auf eine transstadiale Übertragung innerhalb der Zeckenpopulation schließen lässt. Die Prävalenzen in der vorliegenden Studie in gesaugten Zecken waren niedrig (3,8 %) und vergleichbar zu denen von wirtssuchenden Zecken (2,2 %). Es waren hauptsächlich gesaugte *I. ricinus* Zecken positiv. In vorangegangenen Studien wurden niedrige Prävalenzen für CNM in *I. ricinus* Zecken aus Schweden, Italien, Tschechien, der Schweiz, Spanien und der Slowakei (0,4-11,0 %) beschrieben (Andersson und Råberg, 2011; Capelli et al., 2012; Derdákóvá et al., 2014; Lommano et al., 2012; Palomar et al., 2014; Špitalská et al., 2008), was vergleichbar mit den Prävalenzen in gesaugten und wirtssuchenden Zecken der vorliegenden Studie ist. Es konnten in der vorliegenden Studie keine signifikanten Unterschiede in den Prävalenzen zwischen den Jahren, Standorten, Geschlechtern bzw. Entwicklungsstadien der wirtssuchenden Zecken festgestellt werden. In *D. reticulatus* Zecken

wurden in einer Vorgängerstudie bereits relativ hohe Prävalenzen festgestellt (7,7 %). Diese Zeckenspezies wurde somit als potentieller Vektor diskutiert (Silaghi et al., 2012c). In der vorliegenden Studie war eine von 133 gesogenen *D. reticulatus* Zecken positiv, was die Hypothese einer möglichen Vektorfunktion ungeklärt lässt. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen schlussfolgern, dass CNM ein Kleinnager-assoziiertes Pathogen ist, das möglicherweise in Kleinnagern diaplazentar übertragen werden kann und *I. ricinus* Zecken möglicherweise als Brückenvektor auf Fehlwirte dient.

Rehwild wurde bereits als mögliches Reservoir für bestimmte *A. phagocytophilum* Stämme angesehen (Overzier et al., 2013b). In vergangenen Studien aus Tschechien, der Schweiz und Deutschland wurde aufgrund der relativ hohen Prävalenzen (0,5-19,2 %) die Reservoirfunktion auch für Kleinnager wie Rötel- und Gelbhalsmäuse diskutiert (Hartelt et al., 2008; Hulínská et al., 2004; Liz et al., 2000). In dieser Studie waren die Prävalenzen für *A. phagocytophilum* in Kleinsäugetieren insgesamt sehr gering und es gab keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen den Standorten, Jahren und Kleinnagerarten. In einer vergangenen Studie wurde jedoch vermutet, dass aufgrund der hohen Prävalenz in wirtssuchenden Zecken (19,6 %) am urbanen Standort, Kleinnager ein Reservoir für *A. phagocytophilum* sein können, da das Vorkommen von Großwild an diesem Standort ausgeschlossen wurde (Overzier et al., 2013a). Durch die Ergebnisse dieser Studie konnte die Reservoirfunktion von Kleinnagern am urbanen Standort allerdings nicht bekräftigt werden. Jedoch wurde *A. phagocytophilum* bereits in Igel und Vögeln nachgewiesen, womit diese, wie bereits auch für CNM beschrieben, als wahrscheinliches Reservoir am urbanen Standort angesehen werden können (Földvári et al., 2014; Ogden et al., 2008). Zwei co-existente enzootische Lebenszyklen für *A. phagocytophilum*, einerseits in Wühlmäusen und andererseits in Rehwild, wurden in einer früheren Studie vorgeschlagen (Bown et al., 2003). In diesem Zusammenhang wurde außerdem postuliert, dass Feldmäuse ein potentielles Reservoir für einen bestimmten *A. phagocytophilum* Ökotyp im Zusammenhang mit *I. trianguliceps* als Vektor sein können (Bown et al., 2003). In der vorliegenden Studie war eine von sieben gefangenen Feldmäusen positiv, was die Hypothese, dass diese Art ein potentieller Reservoirwirt ist, stützt (Bown et al., 2003). Die Prävalenzen in der vorliegenden Studie waren in gesaugten *I. ricinus* Nymphen signifikant höher als in gesaugten Larven, was die These einer transstadialen Übertragung in Zecken bestätigt. Generell wurde *A. phagocytophilum* in einer relativ weiten Prävalenzspanne (0,7-9,1 %) in *I. ricinus* Zecken aus

unterschiedlichen europäischen Ländern wie Ungarn, Deutschland, der Slowakei und Frankreich nachgewiesen (Derdáková et al., 2014; Hornok et al., 2014; Reis et al., 2011; Schorn et al., 2011a), womit die Prävalenzen in den gesaugten *I. ricinus* Zecken unserer Studie vergleichbar sind. Für zwei positive *I. ricinus*-Nymphen vom renaturierten bzw. vom urbanen Standort konnten die *16S rRNA* Genvarianten bestimmt werden. Die Sequenzierung beider Proben ergab, laut einer nicht offiziellen, aber in früheren Studien bereits verwendeten Nomenklatur unserer Forschungsgruppe, jeweils Variante „A“ (Schorn et al., 2011a; Silaghi et al., 2011b). Dementsprechend wurde Variante „A“ bereits in einer vorangegangenen Studie in wirtssuchenden Zecken am urbanen Standort nachgewiesen (Overzier et al., 2013a). Variante „A“ ist insofern von Bedeutung, da diese Genvariante bereits nachweislich in erkrankten Pferden und Hunden gefunden wurde (Scharf et al., 2011; Silaghi et al., 2011a; 2011b). Da es bisher nur einen humanen Fallbericht gab (Baumgarten et al., 1999), wird diese Genvariante jedoch möglicherweise als weniger pathogen für den Menschen eingeschätzt (Silaghi et al., 2011a). Es wurde bisher diskutiert, dass *D. reticulatus* Zecken potentielle Vektoren für *A. phagocytophilum* sein können. So wurden in einer kürzlich erschienenen Studie 52 *A. phagocytophilum* positive *D. reticulatus* Zecken von insgesamt 203 Zecken gefunden, wobei hierbei anzumerken ist, dass nur vier dieser positiven Proben sequenziert und so gesichert als *A. phagocytophilum* positiv angesehen werden konnten (Karbowski et al., 2014). In der vorliegenden Studie war keine der 133 untersuchten *D. reticulatus* Zecken positiv für *A. phagocytophilum*, sodass unsere Studie die Vektorfunktion dieser Zeckenart nicht stützt. Des Weiteren stützen die Ergebnisse aufgrund der sehr niedrigen Prävalenzen in den meisten Kleinsäugetieren deren potentielle Hauptwirtsfunktion nicht. Es besteht jedoch laut unserer Studie die Möglichkeit, dass Feldmäuse eine Reservoirfunktion für dieses Pathogen einnehmen.

In einer vorangegangenen Studie wurden am silvatischen Standort relativ hohe Prävalenzen für *B. microti* in wirtssuchenden Zecken festgestellt und Kleinsäugetiere in diesem Zusammenhang als Reservoirwirte diskutiert (Overzier et al., 2013b). In anderen Studien aus Kroatien, Slowenien und Deutschland wurden vor allem Rötelmäusen als Hauptreservoir für diese Babesienart diskutiert (Beck et al., 2011; Duh et al., 2003; Hildebrandt et al., 2007; Silaghi et al., 2012b). Die Prävalenzen für *B. microti* in Kleinnagern aus der vorliegenden Studie liegen im unteren Prävalenzbereich im Vergleich mit den stark variierenden Prävalenzraten aus Studien in Großbritannien, Slowenien, Polen und Deutschland (1,6-42,0 %) (Bown et al., 2008; Duh et al., 2003; Karbowski et al., 2004; Pawelczyk et al., 2004; Silaghi et al., 2012b). Mäuse, aus der Familie der Wühlmäuse (Cricetidae) wurden als

Hauptreservoir von *B. microti* beschrieben und eine untergeordnete Rolle wurde für Langschwanzmäuse als Reservoirwirte diskutiert (Bown et al., 2008; Tadin et al., 2012). Dementsprechend wurden in der vorliegenden Studie signifikant höhere Prävalenzen in Wühlmäusen als in Langschwanzmäusen festgestellt. Es gibt jedoch auch Studien mit hohen *B. microti* Prävalenzen in zu den Langschwanzmäusen gehörenden Gelbhalsmäusen (11,8-16,2 %) (Beck et al., 2011; Duh et al., 2003). Für andere *Apodemus*-Arten wie *Ap. agrarius* und *Ap. sylvaticus* wurden bisher nur sehr geringe Prävalenzen festgestellt (Beck et al., 2011; Duh et al., 2003). Jedoch wurde *B. microti* in einer Vorgängerstudie in einer Brandmaus (*Ap. agrarius*) am renaturierten Standort nachgewiesen (Silaghi et al., 2012b). In der vorliegenden Studie waren alle 40 untersuchten Individuen dieser beiden Spezies (*Ap. agrarius*, *Ap. sylvaticus*) negativ. Feldmäuse scheinen eine besondere Rolle als Reservoir für *B. microti* einzunehmen (Bown et al., 2008). Eine von sieben Feldmäusen in der vorliegenden Studie war *B. microti* positiv, was diese Vermutung stützt. Welc-Falęciak et al. hatten Splenomegalie in experimentell *B. microti* infizierten Mäusen beobachtet (Welc-Falęciak et al., 2007). Die positiv getesteten Nager in der vorliegenden Studie machten äußerlich einen gesunden Eindruck, auch wiesen die bei der Nekropsie untersuchten Organe (bis auf die vergrößerten Milzen) keine abnormen Veränderungen auf. Das signifikant höhere Milzgewicht in infizierten *My. glareolus* im Vergleich zu nicht infizierten *My. glareolus* lässt vermuten, dass sich die infizierten *My. glareolus* immunologisch mit *B. microti* auseinandergesetzt haben. *Babesia microti* hat somit vermutlich eine Splenomegalie in infizierten Mäusen hervorgerufen, die wohl auf immunologische Prozesse wie gesteigerte Abwehrzell- und Blutzellproduktion zurückzuführen ist (Watkins et al., 1991). Jedoch ist nicht auszuschließen, dass andere in dieser Studie nicht untersuchte Infektionskrankheiten zu einem erhöhten Milzgewicht geführt haben.

Das Vorkommen von *B. microti* wird vor allem mit silvatischen Habitaten assoziiert (Bown et al., 2008). Dabei wird das Vorhandensein von *B. microti* nicht hauptsächlich mit der Anwesenheit der jeweiligen präferierten Mäuseart in Zusammenhang gebracht. Vielmehr ist das Vorkommen des potentiellen Hauptvektors, *I. trianguliceps* für die Abundanz von *B. microti* entscheidend (Bown et al., 2008). *Ixodes trianguliceps* Zecken, die besonders an Kleinsäuger adaptiert sind, leben meist endophil in Mäusebauten und bevorzugen dabei silvatische Habitate (Bown et al., 2008). Die Vermutung, dass *I. trianguliceps* als Vektor für *B. microti* dient, konnte durch Ergebnisse dieser Studie zumindest teilweise gestützt werden,

da eine von sieben *I. trianguliceps* Zecken *B. microti* positiv war. *Ixodes trianguliceps* Zecken stammten alle vom silvatischen Standort. Bereits in früheren Studien wurden hohe Prävalenzen für *B. microti* in dieser Zeckenart beobachtet (10,7 %) (Nefedova et al., 2013). Da *I. trianguliceps* selten auf größeren Säugern parasitiert und *I. ricinus* eine exophile Spezies ist, können *I. ricinus* Zecken als Brückenvektoren fungieren und somit *B. microti* auf größere Säuger und den Menschen übertragen (Bown et al., 2008; Wójcik-Fatla et al., 2012). In Studien aus Frankreich, Slowenien, der Schweiz, Belgien und den Niederlanden waren *I. ricinus* Zecken zu 0,003-10,1 % *B. microti* positiv (Bonnet et al., 2014; Duh et al., 2001; Foppa et al., 2002; Lempereur et al., 2011; Wielinga et al., 2009). In unserer Studie war diese Zeckenspezies zu einem ebenfalls sehr geringen Prozentsatz positiv (0,002 %). In der vorliegenden Studie waren *Ixodes* spp. Nymphen, jedoch nicht deren Larven *B. microti* positiv, was die vermutete ausgeschlossene transovarielle Übertragung stützt (Spielman et al., 1985). *Dermacentor reticulatus* wurde als Brückenvektor für *B. microti* ebenfalls diskutiert (Karbowski et al., 2004). Da keine der untersuchten *D. reticulatus* Zecken positiv war, können die Ergebnisse dieser Studie diese Vermutung nicht unterstreichen. Die in Europa vorkommenden *B. microti*-Stämme scheinen im Vergleich zu den hochpathogenen Stämmen in den USA, apathogen (Munich/Strain) bzw. nur leicht pathogen zu sein (Jena/Germany Strain) (Hildebrandt et al., 2007). In der vorliegenden Studie waren *B. microti*-Sequenzen von Mäusen und gesaugten Zecken untereinander und zu Sequenzen von wirtssuchenden Zecken vom silvatischen Standort identisch (Overzier et al., 2013b). Diese Ergebnisse stützen die Vermutung dass *B. microti* in Zecken transstadial übertragen werden kann und dass eine Übertragung zwischen Mäusen und Zecken möglich ist. Auch wenn die Sequenzen zu 100 % identisch zum pathogenen Jena/Strain in allen Proben dieser Studie waren, ist an den untersuchten Standorten aufgrund der geringen Prävalenzen nur von einer geringen gesundheitlichen Gefährdung für Mensch und Tier auszugehen. Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen, dass *B. microti* vor allem mit Mäusen der Familie Cricetidae assoziiert ist und dass Langschwanzmäuse, im Besonderen *Ap. agrarius* und *Ap. sylvaticus* zumindest an den untersuchten Standorten für die Übertragung von *B. microti* vermutlich von untergeordneter Bedeutung sind. *Ixodes ricinus* Zecken sind als mögliche Brücken- und *I. trianguliceps* Zecken als mögliche Hauptvektoren für *B. microti* anzusehen.

VI. SCHLUSSFOLGERUNG

CNM wurde zu einer signifikant höheren Prävalenz in Mäusen am renaturierten Standort gefunden, was durch die hohe Anzahl und die große Artenvielfalt an gefangenen Mäusen zu erklären wäre. Aufgrund der hohen CNM Prävalenzen und dem möglichen diaplazentaren Übertragungsweg in Mäusen, ist CNM wahrscheinlich eher ein Nager-assoziiertes als ein Zecken-assoziiertes Pathogen, da außerdem 10-mal so hohe Prävalenzen in Nagern als in gesaugten und wirtssuchenden Zecken nachgewiesen wurden. *Ixodes ricinus* Zecken können dennoch möglicherweise als potentielle Vektoren für Fehlwirte wie den Menschen dienen. Im Kontrast dazu sind die in dieser Studie untersuchten Nagerarten aufgrund der niedrigen Prävalenzen wahrscheinlich nur zufällige Wirte für *A. phagocytophilum*. Signifikant mehr Mäuse, insbesondere Rötelmäuse vom silvatischen Standort waren *B. microti* positiv. Ein Vorkommen von *I. trianguliceps* Zecken war ausschließlich an diesem Standort nachweisbar. *Ixodes* spp. jedoch nicht *D. reticulatus* Zecken waren *B. microti* positiv. Die Zirkulation von *B. microti* scheint dort wahrscheinlicher, wo es eine sympatrische Existenz von Wühlmäusen und *I. trianguliceps* Zecken gibt. Im Gegensatz dazu war die Prävalenz in *Apodemus* spp. gering und somit ist davon auszugehen, dass Mäuse dieser Familie an den untersuchten Standorten für den Erhalt von *B. microti* eine untergeordnete Rolle spielen. Im Zusammenhang damit gab es an diesem Standort im Gegensatz zu den beiden anderen Standorten ein Vorkommen von positiven *I. trianguliceps* Zecken. Damit scheint das Vorkommen von *B. microti* vor allem an Standorte mit einem vorherrschenden und sympatrischen Vorkommen von Wühlmäusen und *I. trianguliceps* Zecken gebunden zu sein. Langschwanzmäuse spielen für den Erhalt von *B. microti* an den untersuchten Standorten eine untergeordnete Rolle. *Ixodes ricinus* Zecken sind mögliche Brückenvektoren für *B. microti*.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Kleinsäuger sind essentiell für die Entwicklung und die Verbreitung von subadulten Schildzecken. Den Kleinsäufern kommt so eine wichtige Rolle als potentielle Reservoirwirte für Zecken-übertragene Pathogene zu. Die Ziele dieser Studie waren unterschiedliche Zecken-übertragene Pathogene in wildlebenden Kleinsäufern nachzuweisen und die Reservoirfunktion der jeweiligen Kleinsäugerarten, im Zusammenhang mit unterschiedlich strukturierten Habitaten, zu evaluieren. Zwischen 2012 und 2013 wurden Kleinsäuger an drei unterschiedlich strukturierten Standorten gefangen: (1) an einem Stadtpark in Regensburg, (2) an einem silvatischen Standort in Tussenhausen im Unterallgäu und (3) an einem renaturierten Standort, der in der Nähe von Leipzig in Sachsen liegt. Zusätzlich wurden Zecken im Jahr 2013 am Waldstandort geflaggt. DNA wurde aus Blut-, Milz- und Gonaden-Proben der Mäuse und aus Mäuseneonaten extrahiert. Auf den Mäusen befindliche Zecken wurden abgesammelt. Aus diesen und den wirtssuchenden Zecken wurde ebenfalls DNA extrahiert. Zusätzlich wurden bereits vorhandene DNA-Proben aus wirtssuchenden Zecken aus den Jahren 2009-2013 bzw. 2011-2012 vom urbanen bzw. vom silvatischen Standort untersucht. Die Proben wurden mittels konventioneller oder Real-Time PCR auf *Anaplasma phagocytophilum*, *Candidatus Neorhlichia mikurensis* (CNM) und *Babesia microti* untersucht.

Insgesamt wurden 631 Kleinsäuger zehn verschiedener Arten gefangen (4 *Apodemus agrarius*, 7 *Microtus arvalis*, 1 *M. agrestis*, 396 *Myodes glareolus*, 2 *Mustela nivalis*, 5 *Sorex coronatus*, 1 *Sorex araneus*, 1 *Talpa europaea*, 36 *Ap. sylvaticus*, 178 *Ap. flavicollis*). Davon wurden insgesamt 36 Mäuse im Stadtpark, 243 am silvatischen und 352 am renaturierten Standort, wo die größte Artenvielfalt vorherrschte (n=8), gefangen. Insgesamt wurden 3.391 Zecken drei verschiedener Arten (8 *Ixodes trianguliceps*, 3.250 *Ixodes ricinus*, 133 *Dermacentor reticulatus*) abgesammelt.

CNM wurde in insgesamt 28,6 % der Kleinsäuger nachgewiesen. Dabei waren 31,6 % *My. glareolus*, 28,1 % *Ap. flavicollis*, 57,1 % *M. arvalis* und 2,7% *Ap. sylvaticus* positiv. Die Prävalenzen unterschieden sich signifikant beim Vergleich der jeweiligen Standorte, wobei die Infektionsrate am renaturierten Standort am höchsten war (χ^2 : 13,4; p: 0,0004). Insgesamt waren 3,8 % der gesogenen und 2,2 % der wirtssuchenden Zecken positiv. In den untersuchten Kleinsäugerföten bzw. -Neonaten, die von positiven Muttertieren stammten, war die Prävalenz für CNM 31,8 %. Insgesamt 60,0 % der positiven Muttertiere hatten wenigstens

einen positiven Foetus oder Neonaten. *Anaplasma phagocytophilum* wurde zu einem geringen Prozentsatz in Nagern festgestellt (0,0-5,6 %), wobei es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Standorten, Jahren und Kleinsäugerarten gab. Jedoch waren gesogene Nymphen (*I. ricinus*) signifikant häufiger befallen als gesogene Larven (χ^2 : 25,1; p: <0,0001). Die Prävalenz für *B. microti* war in Nagern vom Waldstandort (4,6 %) signifikant höher als in Nagern von den beiden anderen Standorten (0-0,6 %) (χ^2 : 11,95; p: 0,00125). *Babesia microti* konnte in *M. arvalis* (14,3 %), *Ap. flavicollis* (0,4 %) und *My. glareolus* (2,3 %) festgestellt werden. *Babesia microti* wurde in 3 von 965 (1 *I. trianguliceps*, 2 *I. ricinus*) gesogenen Zecken festgestellt (0,3 %; 95 % CI: 0,0-1,0). Diese Zecken stammten ausschließlich vom Waldstandort. *Ixodes ricinus* Nymphen waren signifikant häufiger infiziert als *I. ricinus* Larven (χ^2 : 26,7; p <0,0001). Ein Vorkommen von *I. trianguliceps* Zecken war ausschließlich am silvatischen Standort nachweisbar. Gesogene *I. trianguliceps* und *I. ricinus* Zecken waren zu einer geringen Prävalenz positiv (14,3 % bzw. 0,2 %).

Aufgrund der hohen CNM Prävalenzen und dem möglichen diaplazentaren Übertragungsweg in Mäusen, ist CNM wahrscheinlich eher ein Nager-assoziiertes als ein Zecken-assoziiertes Pathogen. Die Prävalenzen in Nagern waren außerdem 10-mal so hoch, als in gesaugten und wirtssuchenden Zecken. Aufgrund der niedrigen Prävalenzen sind die untersuchten Nagerarten wahrscheinlich nur zufällige Wirte für *A. phagocytophilum*. Die Zirkulation von *B. microti* scheint dort wahrscheinlicher, wo es eine sympatrische Existenz von Wühlmäusen und *I. trianguliceps* Zecken gibt. Im Gegensatz dazu war die Prävalenz in *Apodemus* spp. gering und somit ist davon auszugehen, dass Mäuse dieser Familie an den untersuchten Standorten für den Erhalt von *B. microti* eine untergeordnete Rolle spielen.

VII. SUMMARY

Small mammals are of importance for the development and maintenance of immature hard tick stages. Therefore small mammals are crucial as potential reservoir hosts for tick-borne pathogens. The aims of this study were to investigate small mammals for different tick-borne pathogens in order to evaluate the reservoir role of certain small mammal species in relation to differently structured habitats. In 2012 and 2013 small mammals were collected at three differently structured sites: (1) an urban Park in Regensburg, (2) a sylvatic large forest in the Allgaeu, both located in Bavaria and (3) a recently renaturated site which is situated near Leipzig, in Saxony. Additionally questing ticks were collected at the sylvatic site in 2013. Ticks were collected from the small mammals' coats and finally, DNA was extracted from the collected questing ticks and from the small mammals' attached ticks, spleens, blood, fetuses and neonates. Moreover DNA samples from questing ticks from the urban and the sylvatic site, collected in 2009-2013, and respectively in 2011-2012, were available from former studies for further investigations. Samples were screened for *Anaplasma phagocytophilum*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and *Babesia microti* by the use of conventional or real-time PCR.

Altogether 631 small mammals belonging to 10 different species were caught (4 *Apodemus agrarius*, 7 *Microtus arvalis*, 1 *Microtus agrestis*, 396 *Myodes glareolus*, 2 *Mustela nivalis*, 5 *Sorex coronatus*, 1 *Sorex araneus*, 1 *Talpa europaea*, 36 *Apodemus sylvaticus*, 178 *Apodemus flavicollis*). Thirty-three rodents at the urban site and 243 small mammals at the sylvatic site were captured. At the renaturated site most of the small mammals were caught (n=352). This study site showed the highest variability in small mammal species (n=8). In total 3391 ticks were collected belonging to three different species (3250 *Ixodes ricinus*, 8 *Ixodes trianguliceps*, and 133 *Dermacentor reticulatus*).

CNM was detected in 28.6 % of all small mammals. Altogether 31.6 % of the bank voles, 28.1 % of the yellow-necked mice, 57.1 % of the common voles and 2.7 % of the wood mice were positive. The prevalences differed significantly comparing sites, whereby the highest infection rate was found at the renaturated site (χ^2 : 13.3987; p: 0.0004). Male bank voles were significantly more often infected than females at the sylvatic site (OR: 1.9; 95 % CI: 1.3-2.9). Altogether 3.8 % of the engorged and 2.2 % of the questing ticks were positive. The prevalence for CNM for neonates respectively fetuses which belonged to positive dams was 31.8 %; 60.0% of the positive dams had at least one positive fetus respectively neonate.

Anaplasma phagocytophilum was detected by varying low percentages in small mammals per site (0.0-5.6 %), whereas there was no significant difference between the sites, years and species. Attached ticks were significantly more often infected than engorged larvae (χ^2 : 25.1; p: <0.0001). For *B. microti* the prevalence was higher in rodents from the sylvatic site (4.6 %) than in rodents from both of the other sites (0.0-0.6 %) (χ^2 :11.95; p: 0.00125). *Babesia microti* was detected in *M. arvalis* (14.3 %), *Ap. flavicollis* (0.4 %) und *My. glareolus* (2.3 %). *Babesia microti* DNA was found in 3 of 965 (1 *I. trianguliceps*, 2 *I. ricinus*) engorged ticks (0.3 %; 95 % CI: 0-1). These ticks were exclusively found at the sylvatic site. *Ixodes ricinus* nymphs were significantly more often infected than *I. ricinus* larvae (χ^2 :26.72; p <0.0001). *I. trianguliceps* was exclusively detected at the sylvatic site. *Babesia microti* was found in engorged *I. trianguliceps* and *I. ricinus* (14.3 % respectively 0.2 %).

CNM is most probably rather a rodent-associated than a tick-borne pathogen. Moreover the prevalences in rodents were approximately ten times higher than in engorged respectively in questing ticks. According to the low *A. phagocytophilum* prevalences found in small mammals from this study, the investigated small mammal species play a subordinate role as reservoirs for this pathogen. It may well be assumed that the natural circulation of *B. microti* is related to habitats with a sympatric existence of voles and *I. trianguliceps* ticks. In contrast, the prevalences in *Apodemus* spp. were low, which leads to the conclusion that individuals belonging to this family participate only subordinately in the maintenance of *B. microti*.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Achazi K., Růžek D., Donoso-Mantke O., Schlegel M., Ali H.S., Wenk M., Schmidt-Chanasit J., Ohlmeyer L., Rühle F., Vor T., Kiffner C., Kallies R., Ulrich R.G., Niedrig M., 2011, Rodents as sentinels for the prevalence of tick-borne encephalitis virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 641-7.

Akkoyunlu M., Malawista S.E., Anguita J., Fikrig E., 2001, Exploitation of interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis by the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Infect Immun* 69, 5577-88.

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.

Alekseev A.N., Dubinina H.V., Van De Pol I., Schouls L.M., 2001, Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia. *J Clin Microbiol* 39, 2237-2242.

Anderson J. F., Johnson R. C., Magnarelli L. A., Hyde F. W., Myers J. E., 1986, *Peromyscus leucopus* and *Microtus pennsylvanicus* simultaneously infected with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti*. *J Clin Microbiol* 23, 135-137.

Andersson M., Råberg L., 2011, Wild rodents and novel human pathogen *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, Southern Sweden. *Emerg Infect Dis* 17, 1716-1718.

Andersson M., Scherman K., Råberg L., 2013, Infection dynamics of the tick-borne pathogen *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and co-infections with *Borrelia afzelii* in bank voles in Southern Sweden. *Appl Environ Microbiol* 80, 1645-1649.

Ayllón N., Villar M., Busby A.T., Kocan K.M., Blouin E.F., Bonzón-Kulichenko E., Galindo R.C., Mangold A.J., Alberdi P., Pérez de la Lastra J.M., Vázquez J., de la Fuente J., 2013, *Anaplasma phagocytophilum* inhibits apoptosis and promotes cytoskeleton rearrangement for infection of tick cells. *Infect Immun* 81, 2415-25.

Baldrige G.G., Scoles G.A., Burkhardt N.Y., Schloeder B., Kurtti T.J., Munderloh U.G., 2009, Transovarial Transmission of *Francisella*-Like Endosymbionts and *Anaplasma phagocytophilum* Variants in *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 46, 625–632.

Baráková I., Derdáková M., Carpi G., Rosso F., Collini M., Tagliapietra V., Ramponi C., Hauffe H.C., Rizzoli A., 2014, Genetic and Ecologic Variability among *Anaplasma phagocytophilum* Strains, Northern Italy. *Emerg Infect Dis* 20, 1082–1085.

Barandika J.F., Hurtado A., García-Esteban C., Gil H., Escudero R., Barral M., Jado I., Juste R.A., Anda P., García-Pérez A.L., 2007, Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. *Appl Environ Microbiol* 73, 6166-6171.

Bauch R.J., Danner G., 1988, The discovery of *Dermacentor reticulatus* (Ixodida, Ixodidae) in the East German districts of Leipzig and Halle. *Angew Parasitol* 29(4), 250-4.

Baumann D., Pusterla N., Péter O., Grimm F., Fournier P.E., Schär G., Bossart W., Lutz H., Weber R., 2003, Fever after a tick bite: clinical manifestations and diagnosis of acute tick bite-associated infections in northeastern Switzerland. *Deut Med Wochenschr* 128, 1042-1047.

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(11), 3448–3451.

Blaňarová L., Stanko M., Carpi G., Miklisová D., Víchová B., Mošanský L., Bona M., Derdáková M., 2014, Distinct *Anaplasma phagocytophilum* genotypes associated with *Ixodes trianguliceps* ticks and rodents in Central Europe. *Ticks Tick Borne Dis* 5, 928-38.

Beck R., Vojta L., Čurković S., Mrljak V., Margaletić J., Habrun B., 2011, Molecular survey of *Babesia microti* in wild rodents in central Croatia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 81-83.

Beninati T., Piccolo G., Rizzoli A., Genchi C., Bandi C., 2006, Anaplasmatataceae in wild rodents and roe deer from Trento Province (northern Italy). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 25, 677–678.

Bjöersdorff A., Svendenius L., Owens J.H., Massung R.F., 1999, Feline granulocytic ehrlichiosis - a report of a new clinical entity and characterisation of the infectious agent. *J Small Anim Pract* 40, 20-24.

Bonferroni C. E., 1936, Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità, Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze.

Bonnet S., Michelet L., Moutailler S., Cheval J., Hébert C., Vayssier-Taussat M., Eloit M., 2014, Identification of parasitic communities within European ticks using next-generation sequencing. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e2753.

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

Bown K.J., Lambin X., Telford G., Ogden N.H., Telfer S., Woldehiwet Z., Birtles R.J., 2008, Relative importance of *Ixodes ricinus* and *Ixodes trianguliceps* as vectors for *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in field vole (*Microtus agrestis*) populations. *Appl Environ Microbiol* 74, 7118-7125.

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.

Brouqui P., Bacellar F., Baranton G., Birtles R.J., Bjoersdorff A., Blanco J.R., Caruso G., Cinco M., Fournier P.E., Francavilla E., Jensenius M., Kazar J., Laferl H., Lakos A., Lotric-Furlan S., Maurin M., Oteo J.A., Parola P., Perez-Eid C., Peter O., Postic D., Raoult D., Tellez A., Tselentis Y., Wilske B., ESCMID Study Group on *Coxiella*, *Anaplasma*, *Rickettsia* and *Bartonella*, European Network for Surveillance of Tick-Borne Diseases, 2004, Guidelines

for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect* 10, 1108-32.

Buffet J.P., Marsot M., Vaumourin E., Gasqui P., Masségli S., Marcheteau E., Huet D., Chapuis J.L., Pisanu B., Ferquel E., Halos L., Vourc'h G., Vayssier-Taussat M., 2012, Co-infection of *Borrelia afzelii* and *Bartonella* spp. in bank voles from a suburban forest. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 35, 583-9.

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

Burri C., Schumann O., Schumann C., Gern L., 2014, Are *Apodemus* spp. mice and *Myodes glareolus* reservoirs for *Borrelia miyamotoi*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, *Rickettsia helvetica*, *R. monacensis* and *Anaplasma phagocytophilum*? *Ticks Tick Borne Dis* 5, 245-51.

Cao W., Zhan L., He J., Foley J.E., De Vlas S.J., Wu X., Yang H., Richardus J.H., Habbema J.D.F., 2006, Natural *Anaplasma phagocytophilum* infection of ticks and rodents from a forest area of jilin province, China. *Am J Trop Med Hyg* 5, 664-668.

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

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.

CDC, 2012, <http://www.cdc.gov/anaplasmosis/stats/>. Center for Disease Control and Prevention.

Cerný, V., 1972, The tick fauna of Czechoslovakia. *Folia parasitol* 19, 87-92.

Charrel R.N., Attoui H., Butenko A.M., Clegg J.C., Deubel V., Frolova T.V., Gould E.A., Gritsun T.S., Heinz F.X., Labuda M., Lashkevich V.A., Loktev V., Lundkvist A., Lvov D.V., Mandl C.W., Niedrig M., Papa A., Petrov V.S., Plyusnin A., Randolph S., Süss J., Zlobin V.I., de Lamballerie X., 2004, Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin Microbiol Infect* 10, 1040-1055.

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.

Cho M.K., Kee S.H., Song H.J., Kim K.H., Song K.J., Baek L.J., Kim H.H., Oh H.B., Kim Y.W., Chang W.H., 1998, Infection rate of *Leptospira interrogans* in the field rodent, *Apodemus agrarius*, in Korea. *Epidemiol Infect* 121, 685-90.

Choi K.S., Garyu J., Park J., Dumler J.S., 2003, Diminished adhesion of *Anaplasma phagocytophilum*-infected neutrophils to endothelial cells is associated with reduced expression of leukocyte surface selectin. *Infect Immun* 71, 4586-94.

Choi K.S., Grab D.J., Dumler J.S., 2004, *Anaplasma phagocytophilum* infection induces protracted neutrophil degranulation. *Infect Immun* 72, 3680–3683.

Choi K.S., Park J.T., Dumler J.S., 2005, *Anaplasma phagocytophilum* delay of neutrophil apoptosis through the p38 mitogen-activated protein kinase signal pathway. *Infect Immun* 73, 8209-18.

Christova I., Gladnishka T., 2005, Prevalence of infection with *Francisella tularensis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in rodents from an endemic focus of tularemia in Bulgaria. *Ann Agric Environ Med* 12, 149-52.

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

Coipan E.C., Jahfari S., Fonville M., Maassen C.B., van der Giessen J., Takken W., Takumi

K., Sprong H., 2013, Spatiotemporal dynamics of emerging pathogens in questing *Ixodes ricinus*. *Front Cell Infect Microbiol* 3, 36.

Cornillot E., Dassouli A., Garg A., Pachikara N., Randazzo S., Depoix D., Carcy B., Delbecq S., Frutos R., Silva J.C., Sutton R., Krause P.J., Mamoun C.B., 2013, Whole genome mapping and re-organization of the nuclear and mitochondrial genomes of *Babesia microti* isolates. *PLoS One* 8, 72657.

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.

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., 2005a, Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *J Clin Microbiol* 43, 1309-1317.

de la Fuente J., Naranjo V., Ruiz-Fons F., Hofle U., Fernandez De Mera I.G., Villanua D., Almazan C., Torina A., Caracappa S., Kocan K.M., Gortazar C., 2005b, Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in central Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5, 390-401.

de la Fuente J., Estrada-Pena A., Venzal J.M., Kocan K.M., Sonenshine D.E., 2008, Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front Biosci* 13, 6938-46.

Deplazes P., Eckert J., Samson-Himmelstjerna G., Zahner H., 2012, *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*, 3. Aufl. Edition. Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH&Co. KG, Stuttgart.

Derdáková M., Václav R., Pangrácova-Blaňárová L., Selyemová D., Koči J., Walder G., Špitalská E., 2014, *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis and its co-circulation with *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks across ecologically different habitats of

Central Europe. *Parasit Vectors* 7, 160.

Diniz P.P., Schulz B.S., Hartmann K., Breitschwerdt E.B., 2011, “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” infection in a dog from Germany. *J Clin Microbiol* 49, 2059–2062.

Dizij A., Kurtenbach K., 1995, *Clethrionomys glareolus*, but not *Apodemus flavicollis*, acquires resistance to *Ixodes ricinus* L., the main European vector of *Borrelia burgdorferi*. *Parasite Immunol* 17, 177-83.

Dolch D., 1995, Beiträge zur Säugetierfauna des Landes Brandenburg – Die Säugetiere des ehemaligen Bezirkes Potsdam. *Natursch u Landsch pfl Brb* 3, Sonderheft: 1 – 95.

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-Županc T., 2001, Diversity of *Babesia* infecting European sheep ticks. *J Clin Microbiol* 39, 3395-7.

Duh D., Petrovec M., Trilar T., Avsic-Zupanc T., 2003, The molecular evidence of *Babesia microti* infection in small mammals collected in Slovenia. *Parasitology* 126, 113-117.

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(12), 1828-34.

Essbauer S., Pfeffer M., Meyer H., 2010, Zoonotic poxviruses. *Vet Microbiol* 140, 229-36.

Fehr J.S., Bloemberg G.V., Ritter C., Hombach M., Luscher T.F., Weber R., Keller P.M., 2010, Septicemia caused by tick-borne bacterial pathogen *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. *Emerg Infect Dis* 16, 1127–1129.

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(3), 145-9.

Fisher R.A., 1935, The logic of inductive inference. *J R Stat Soc Series A* 98, 39-54.

Földvári G., Jahfari S., Rigó K., Jablonszky M., Szekeres S., Majoros G., Tóth M., Molnár V., Coipan E.C., Sprong H., 2014, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and *Anaplasma phagocytophilum* in urban Hedgehogs. *Emerg Infect Dis* 20(3), 496-498.

Foley J.E., Nieto N.C., Massung R., Barbet A., Madigan J., Brown R.N., 2009, Distinct ecologically relevant strains of *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg Infect Dis* 15, 842-843.

Foley J.E., Nieto N.C., 2011, The ecology of tick-transmitted infections in the redwood chipmunk (*Tamias ochrogenys*). *Ticks Tick Borne Dis* 2, 88–93.

Foppa I.M., Krause P.J., Goethert H., Gern L., Brand B., Telford S.R., 2002, Entomologic and Serologic Evidence of Zoonotic Transmission of *Babesia microti*, Eastern Switzerland. *Emerg Infect Dis* 8, 722-726.

Forstdirektion Oberbayern-Schwaben: Managementplan zum FFH-Gebiet 7829-301 “Angelberger Forst“, 2004.

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

Franke J., Hildebrandt A., Meier F., Straube E., Dorn W., 2011, Prevalence of Lyme disease agents and several emerging pathogens in questing ticks from the German Baltic coast. *J Med Entomol* 48, 441-444.

Friedman C.S., Andree K.B., Beauchamp K.A., Moore J.D., Robbins T.T., Shields J.D., Hedrick R.P., 2000, '*Candidatus Xenohalictis californiensis*', a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 847-55.

García J.C., Núñez M.J., Castro B., Fraile F.J., López A., Mella M.C., Blanco A., Sieira C., Loureiro E., Portillo A., Oteo J.A., 2006, Human anaplasmosis: the first Spanish case confirmed by PCR. *Ann N Y Acad Sci* 1078, 545-7.

Gern L., 2005, Die Biologie der *Ixodes ricinus* Zecke. *Therapeutische Umschau* 62(11), 707-712.

Gingrich J.B., 2001, Regional Disease Vector Ecology Profile Central Europe, PN, Washington.

Glatz M., Müllegger R.R., Maurer F., Fingerle V., Achermann Y., Wilske B., Bloemberg G.V., 2014, Detection of *Candidatus Neohrlichia mikurensis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies and *Anaplasma phagocytophilum* in a tick population from Austria. *Ticks Tick Borne Dis* 5, 139-44.

Gokce H.I., Woldehiwet Z., 1999, Differential haematological effects of tick-borne fever in sheep and goats. *Zentralbl Veterinarmed B* 46(2), 105-15.

Gomez-Chamorro A., Prevalence and Seasonality of *Anaplasma phagocytophilum* in Questing *Ixodes ricinus* Ticks in Southern Germany: A Five-year Follow-up Study [Master Arbeit]. München: Ludwig-Maximilians-Universität. LMU München.

Granick J.L., Reneer D.V., Carlyon J.A., Borjesson D.L., 2008, *Anaplasma phagocytophilum* infects cells of the megakaryocytic lineage through sialylated ligands but fails to alter platelet

production. J Med Microbiol 57, 416-23.

Granquist E.G., Aleksandersen M., Bergström K., Dumler S.J., Torsteinbø W.O., Stuen S., 2010, A morphological and molecular study of *Anaplasma phagocytophilum* transmission events at the time of *Ixodes ricinus* tick bite. Acta Vet Scand 52, 43.

Halos L., Vourc'h G., Cotte V., Gasqui P., Barnouin J., Boulous 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, 316-9.

Hapunik J., Víchová B., Karbowski G., Wita I., Bogdaszewski M., Pet'ko B., 2011, Wild and farm breeding cervids infections with *Anaplasma phagocytophilum*. Ann Agric Environ Med 18, 73-7.

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, 109–116.

Hauer S., Ansorge H., Zöphel U., 2009, Atlas der Säugetiere Sachsens Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie.

Hauffe H.C., Niklasson B., Olsson T., Bianchi A., Rizzoli A., Klitz W., 2010, Ljungan virus detected in bank voles (*Myodes glareolus*) and yellow-necked mice (*Apodemus flavicollis*) from Northern Italy. J Wildl Dis 46, 262-6.

Heile C., Heydorn A.O., Schein E., 2006, *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794)-distribution, biology and vector for *Babesia canis* in Germany. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 119, 330-4.

Herron M.J., Ericson M.E., Kurtti T.J., Munderloh U.G., 2005, The interactions of *Anaplasma phagocytophilum*, endothelial cells, and human neutrophils. Ann N Y Acad Sci 1063, 374-82.

Hersh M.H., Tibbetts M., Strauss M., Ostfeld R.S., Keesing F., 2012, Reservoir Competence of Wildlife Host Species for *Babesia microti*. Emerg Infect Dis 18, 1951–1957.

Heyman P., Cochez C., Hofhuis A., van der Giessen J., Sprong H., Porter S.R., Losson B., Saegerman C., Donoso-Mantke O., Niedrig M., Papa A., 2010, A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8, 33-50.

Hildebrandt A., Hunfeld K.P., Baier M., Krumbholz A., Sachse S., Lorenzen T., Kiehntopf M., Fricke H.J., Straube E., 2007, First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26, 595-601.

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

Hildebrandt A., Franke J., Schmoock G., Pauliks K., Krämer A., Straube E., 2011, Diversity and coexistence of tick-borne pathogens in central Germany. *J Med Entomol* 48, 651-655.

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

Hing M., Woestyn S., Van Bosterhaut B., Desbonnet Y., Heyman P., Cochez C., Silaghi C., Sprong H., Fournier P.E., Raoult D., Neirinckx P., Heuninckx W., 2014, Diagnosis of human granulocytic anaplasmosis in Belgium by combining molecular and serological methods. *New Microbes New Infect* 2, 177-178.

Hodges J.L., Lehmann E.L., 1963, Estimation of location based on ranks. *Annals of Mathematical Statistics* 34, 598-611.

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

Honzáková E., 1971, Development of some tick species under standard laboratory conditions. *Folia Parasitol (Praha)* 18(4), 357-63.

Hornok S., Elek V., de la Fuente J., Naranjo V., Farkas R., Majoros G., Földvári G., 2007,

First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary. *Vet Microbiol* 122(3-4), 316-22.

Hornok S., Horváth G., Jongejan F., Farkas R., 2012, Ixodid ticks on ruminants, with on-host initiated moulting (apolysis) of *Ixodes*, *Haemaphysalis* and *Dermacentor* larvae. *Vet Parasitol* 187(1-2), 350-3.

Hornok S., Meli M.L., Gönczi E., Hofmann-Lehmann R., 2013, First evidence of *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in Hungary. *Parasit Vectors* 6, 267.

Hornok S., Meli M.L., Gönczi E., Halász E., Takács N., Farkas R., Hofmann-Lehmann R., 2014, Occurrence of ticks and prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* s. l. in three types of urban biotopes: forests, parks and cemeteries. *Ticks Tick Borne Dis* 5, 785-9.

Horowitz H.W., Kilchevsky E., Haber S., Agüero-Rosenfeld M., Kranwinkel R., James E.K., Wong S.J., Chu F., Liveris D., Schwartz I., 1998, Perinatal Transmission of the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *N Engl J Med* 339, 375-378.

Hubalek Z., Treml F., Halouzka J., Juricova Z., Hunady M., Janik V., 1996, Frequent isolation of *Francisella tularensis* from *Dermacentor reticulatus* ticks in an enzootic focus of tularaemia. *Med Vet Entomol* 10, 241-246.

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

Hunfeld K.P., Lambert A., Kampen H., Albert S., Epe C., Brade V., Tenter A.M., 2002, Seroprevalence of *Babesia* infections in humans exposed to ticks in midwestern Germany. *J Clin Microbiol* 40, 2431-6.

Immler R., 1973, Untersuchungen zur Biologie und Ökologie der Zecke *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) (Ixodidae) in einem endemischen Vorkommensgebiet. Mitt Schweiz entomol Ges 46, 1-70.

Jahfari S., Fonville M., Hengeveld P., Reusken C., Scholte E.J., Takken W., Heyman P., Medlock J., Heylen D., Kleve J., Sprong H., 2012, Prevalence of *Neohhrlichia mikurensis* in ticks and rodents from north-west Europe. Parasit Vectors 5, 74.

Jahfari S., Coipan E.C., Fonville M., van Leeuwen A.D., Hengeveld P., Heylen D., Heyman P., van Maanen C., Butler C.M., Földvári G., Szekeres S., van Duijvendijk G., Tack W., Rijks J.M., van der Giessen J., Takken W., van Wieren S.E., Takumi K., Sprong H., 2014, Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. Parasit Vectors 15, 365.

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, 3-14.

Kakoma I., Mehlhorn H., 1993, Babesia of domestic animals. In J. P. Kreier, Parasitic protozoa. Academic Press, San Diego, Calif 2 (7), 141-216.

Kálmán D., Sréter T., Széll Z., Egyed L., 2003, *Babesia microti* infection of anthropophilic ticks (*Ixodes ricinus*) in Hungary. Ann Trop Med Parasitol 97, 317-9.

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

Karbowiak G., Vichová B., Slivinska K., Werszko J., Didyk J., Peřko B., Stanko M., Akimov I., 2014, The infection of questing *Dermacentor reticulatus* ticks with *Babesia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in the Chernobyl exclusion zone. Vet Parasitol 204(3-4), 372-5.

Katargina O., Geller J., Vasilenko V., Kuznetsova T., Järvekülg L., Vene S., Lundkvist A.,

Golovljova, I., 2011, Detection and Characterization of *Babesia* Species in *Ixodes* Ticks in Estonia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 923-928.

Kawahara M., Rikihisa Y., Isogai E., Takahashi M., Misumi H., Suto C., Shibata S., Zhang C., Tsuji M., 2004, Ultrastructure and phylogenetic analysis of '*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis' in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1837–1843.

Kaysser P., Seibold E., Mätz-Rensing K., Pfeffer M., Essbauer S., Splettstoesser W.D., 2008, Re-emergence of tularemia in Germany: presence of *Francisella tularensis* in different rodent species in endemic areas. *BMC Infect Dis* 8, 157.

Kiffner C., Vor T., Hagedorn P., Niedrig M., Rühle F., 2011, Factors affecting patterns of tick parasitism on forest rodents in tick-borne encephalitis risk areas, Germany. *Parasitol Res* 108, 323-35.

Kim C.M., Yi Y.H., Yu D.H., Lee M.J., Cho M.R., Desai A.R., Shringi S., Klein T.A., Kim H.C., Song J.W., Baek L.J., Chong S.T., O'guinn M.L., Lee J.S., Lee I.Y., Park J.H., Foley J., Chae J.S., 2006, Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. *Appl Environ Microbiol* 72, 5766-76.

Kjemtrup A.M., Conrad P.A., 2000, Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *Int J Parasitol* 30,1323-37.

Klempa B., Schmidt H.A., Ulrich R., Kaluz S., Labuda M., Meisel H., Hjelle B., Krüger D.H., 2003, Genetic interaction between distinct Dobrava hantavirus subtypes in *Apodemus agrarius* and *A. flavicollis* in nature. *J Virol* 77, 804-9.

Kohn B., Silaghi C., Galke D., Arndt G., Pfister K., 2011, Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Res Vet Sci* 91, 71-76.

Kovalevskii V., Korenberg E.I., Gorelova N.B., Nefedova V.V., 2013, The ecology of *Ixodes trianguliceps* ticks and their role in the natural foci of ixodid tick-borne borrelioses in the

Middle Urals Yu. Entomological Rev 8, 1073-1083.

Krause P.J., Telford S. III, Spielman A., Ryan R., Magera J., Rajan T.V., Christianson D., Alberghini T.V., Bow L., Persing D., 1996, Comparison of PCR with blood smear and inoculation of small animals for diagnosis of *Babesia microti* parasitemia. J Clin Microbiol 34, 2791-2794.

Krücken J., Schreiber C., Maaz D., Kohn M., Demeler J., Beck S., Schein E., Olias P., Richter D., Matuschka F.R., Pachnicke S., Krieger K., Kohn B., von Samson-Himmelstjerna G., 2013, A novel high-resolution melt PCR assay discriminates *Anaplasma phagocytophilum* and „*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis“. J Clin Microbiol 51, 1958-61.

Küchler L., Harnapp S., 2004, Gewässergütebericht 2003. Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie.

Kuiken T., van Dijk J.E., Terpstra W.J., Bokhout B.A., 1991, The role of the common vole (*Microtus arvalis*) in the epidemiology of bovine infection with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. Vet Microbiol 28, 353-61.

Laakkonen J., Kallio E.R., Kallio-Kokko H., Vapalahti O., Vaheri A., Henttonen H., 2006, Is there an association of Pneumocystis infection with the presence of arena-, hanta-, and poxvirus antibodies in wild mice and shrews in Finland? Parasitology 132, 461-6.

Labuda M., Kozuch O., Zuffová E., Elecková E., Hails R.S., Nuttall R.A., 1997, Tick-Borne Encephalitis Virus Transmission between Ticks Cofeeding on Specific Immune Natural Rodent Hosts. Virology 235, 138–143.

Laurenson M.K., Norman R.A., Gilbert L., Reid H.W., Hudson P.J., 2003, Identifying Disease Reservoirs in Complex Systems: Mountain Hares as Reservoirs of Ticks and Louping-III Virus, Pathogens of Red Grouse. J Anim Ecol 72, 177-185

Lee S.H., Jung K.D., Lee J.H., Kim S.C., Kim J.H., Jang W.J., Park K.H., 2002, Characterization of *Borrelia afzelii* isolated from *Ixodes nipponensis* and *Apodemus agrarius*

in Chungju, Korea, by PCR-rFLP analyses of ospC gene and rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer. *Microbiol Immunol* 46, 677-83.

Lempereur L., De Cat A., Caron Y., Madder M., Claerebout E., Saegerman C., Losson B., 2011, First molecular evidence of potentially zoonotic *Babesia microti* and *Babesia* sp. EU1 in *Ixodes ricinus* ticks in Belgium. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 125-30.

Levin M.L., Nicholson W.L., Massung R.F., Sumner J.W., Fish D., 2002, Comparison of the Reservoir Competence of Medium-Sized Mammals and *Peromyscus leucopus* for *Anaplasma phagocytophilum* in Connecticut. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2(3), 125-136.

Li H., Jiang J.-F., Liu W., Zheng Y.-C., Huo Q.-B., Tang K., Zuo S.-Y., Liu K., Jiang B.-G., Yang H., Cao W.-C., 2012, Human Infection with *Candidatus Neohrlichia mikurensis*, China. *Emerg Infect Dis* 8(10), 1636-1639.

Linzey A.V., Matson J., Timm R., 2008, "*Peromyscus leucopus*". IUCN Red List of Threatened Species. International Union for Conservation of Nature Version 2009. 2.

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.

Lommano E., Bertaiola L., Dupasquier C., Gern L., 2012, Infections and coinfections of questing *Ixodes ricinus* ticks by emerging zoonotic pathogens in Western Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 78, 4606-4612.

Lotric-Furlan S., Rojko T., Petrovec M., Avsic-Zupanc T., Strle F., 2006, Epidemiological, clinical and laboratory characteristics of patients with human granulocytic anaplasmosis in Slovenia. *Wien Klin Wochenschr* 118(21-22), 708-13.

Lucius R., Loos-Frank B., 2008, *Biologie von Parasiten (Springer-Lehrbuch)*. Springer; Auflage: 2. Aufl. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

- Majazki J., Wüppenhorst N., Hartelt K., Birtles R., von Loewenich F.D., 2013, *Anaplasma phagocytophilum* strains from voles and shrews exhibit specific *ankA* gene sequences. *Vet Res* 9, 235.
- Mangold A.J., Bargues M.D., Mas-Coma S., 1998, Mitochondrial *16S rDNA* sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among *Metastricata* (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res* 84(6), 478-84.
- 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.
- Massung R.F., Priestley R.A., Miller N.J., Mather T.N., Levin M.L., 2003, Inability of a variant strain of *Anaplasma phagocytophilum* to infect mice. *J Infect Dis* 188, 1757-63.
- Massung R.F., Levin M.L., Munderloh U.G., Silverman D.J., Lynch M.J., Gaywee J.K., Kurtti T.J., 2007, Isolation and propagation of the Ap-Variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum* in a tick cell line. *J Clin Microbiol* 45, 2138-43.
- Mathis A., Hilpertshauer H., Deplazes P., 2006, Piroplasms of ruminants in Switzerland and zoonotic significance of *Babesia*. *Schweiz Arch Tierheilkd* 148, 151-9.
- Matsumoto K., Grzeszczuk A., Brouqui P., Raoult D., 2009, *Rickettsia* and *Anaplasma phagocytophilum* in *Dermacentor reticulatus* ticks collected from Bialowieza Primeval Forest European bison (*Bison bonasus bonasus*), Poland. *Clin Microbiol Infect* 15, 386-387.
- Matsumoto K., Joncour G., Lamanda P., Inokuma H., Brouqui P., 2007, Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia* sp. HF strains in *Ixodes ricinus* ticks in Brittany, France. *Clin Microbiol Infect* 13, 338-341.
- Maurer F.P., Keller P.M., Beuret C., Joha C., Achermann Y., Gubler J., Bircher D., Karrer U., Fehr J., Zimmerli L., Bloemberg G.V., 2013, Close geographic association of human neoehrlichiosis and tick populations carrying "*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis" in

eastern Switzerland. J Clin Microbiol 51, 169-76.

May K., Strube C., 2014, Prevalence of Rickettsiales (*Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp.) in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the city of Hamburg, Germany. Parasitol Res 113, 2169-75.

Meerburg B.G., Singleton G.R., Kijlstra A., 2009, Rodent-borne diseases and their risks for public health. Crit Rev Microbiol 35, 221-70.

Michalik J., Stańczak J., Racewicz M., Cieniuch S., Sikora B., Szubert-Kruszyńska A., Grochowalska R., 2009, Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in wild cervids and feeding *Ixodes ricinus* ticks from west-central Poland. Clin Microbiol Infect 15, 81-3.

Mills J.N., Ksiazek T.G., Peters C.J., Childs J.E., 1999, Long-term studies of hantavirus reservoir populations in the southwestern United States: a synthesis. Emerg Infect Dis 5(1), 135-142.

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.

Mosteller F., 1968, Association and Estimation in Contingency Tables. Journal of the American Statistical Association (American Statistical Association) 63 (321), 1-28.

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.

Naitou H., Kawaguchi D., Nishimura Y., Inayoshi M., Kawamori F., Masuzawa T., Hiroi M., Kurashige H., Kawabata H., Fujita H., Ohashi N., 2006, Molecular identification of *Ehrlichia* species and '*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis' from ticks and wild rodents in Shizuoka and

Nagano Prefectures, Japan. *Microbiol Immunol* 50, 45-51.

Nefedova V.V., Korenberg E., Kovalevski Yu. V., Samokhvalov M.V., Gorelova N.B., 2013, The role of *Ixodes trianguliceps* tick larvae in circulation of *Babesia microti* in the Middle Urals. *Entomol Rev* 93, 258-266.

Nieder M., Silaghi C., Hamel D., Pfister K., Schmäschke R., Pfeffer M., 2012, Tick-borne fever caused by *Anaplasma phagocytophilum* in Germany. First laboratory confirmed case in a dairy cattle herd. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 40, 101-106.

Nieto N.C., Leonhard S., Foley J.E., Lane R.S., 2010, Coinfection of western gray squirrel (*Sciurus griseus*) and other sciurid rodents with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Anaplasma phagocytophilum* in California. *J Wildl Dis* 46, 291–296.

Nohýnková E., Kubek J., Měšťánková O., Chalupa P., Hubálek Z., 2003, A case of *Babesia microti* imported into the Czech Republic from the USA. *Cas Lek Cesk* 142, 377-81.

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.

Olsson G.E., White N., Ahlm C., Elgh F., Verlemyr A.-C., Juto P., Palo R.T., 2002, Demographic factors associated with hantavirus infection in bank voles - *Clethrionomys glareolus*. *Emerg Infect Dis* 9(10), 924-929.

Olsson G.E., White N., Hjältén J., Ahlm C., 2005, Habitat factors associated with bank voles (*Clethrionomys glareolus*) and concomitant hantavirus in northern Sweden. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5, 315-23.

Overzier E., Pfister K., Thiel C., Herb I., Mahling M., Silaghi C., 2013a, *Anaplasma phagocytophilum* in Questing *Ixodes ricinus* Ticks: Comparison of Prevalences and Partial *16S rRNA* Gene Variants in Urban, Pasture, and Natural Habitats. *Appl Environ Microbiol* 79(5), 1730-1734.

Overzier E., Pfister K., Herb I., Mahling M., Böck Jr. G., Silaghi C., 2013b, Detection of tick-borne pathogens in roe deer (*Capreolus capreolus*), questing ticks (*Ixodes ricinus*) and ticks infesting roe deer in southern Germany. *Ticks Tick Borne Dis* 4, 320–328.

Overzier E., Pfister K., Thiel C., Herb I., Mahling M., Silaghi C., 2013c, Diversity of *Babesia* and *Rickettsia* Species in Questing *Ixodes ricinus*: A Longitudinal Study in Urban, Pasture, and Natural Habitats. *Vector Borne Zoonotic Dis* 13, 559-564.

Overzier E., 2013, Habitatabhängige Prävalenzunterschiede zeckenübertragener Erreger in *Ixodes ricinus* und das Reservoirpotential von Rehwild [Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians-Universität. LMU München

Palomar A.M., García-Álvarez L., Santibáñez S., Portillo A., Oteo J.A., 2014, Detection of tick-borne '*Candidatus* Neohrlichia mikurensis' and *Anaplasma phagocytophilum* in Spain in 2013. *Parasit Vectors* 7, 57.

Pan H., Liu S., Ma Y., Tong S., Sun Y., 2003, Ehrlichia-like organism gene found in small mammals in the suburban district of Guangzhou of China. *Ann N Y Acad Sci* 990,107–111.

Pangráčová L., Derdáková M., Pekarík L., Hviscova I., Vichova B., Stanko M., Hlavata H., Petko B., 2013, *Ixodes ricinus* abundance and its infection with the tick-borne pathogens in urban and suburban areas of Eastern Slovakia. *Parasit Vectors* 6, 238.

Parson W., Pegoraro K., Niederstätter H., Föger M., Steinlechner M., 2000, Species identification by means of the *cytochrome b* gene. *Int J Legal Med* 114, 23–28.

Pawelczyk A., Bajer A., Behnke J.M., Gilbert F.S., Siński E., 2004. Factors affecting the component community structure of haemoparasites in common voles (*Microtus arvalis*) from the Mazury Lake district region in Poland. *Parasitol Res* 92, 270-84.

Paziewska A., Zwolińska L, Harris P.D., Bajer A., Siński E., 2010, Utilisation of rodent species by larvae and nymphs of hard ticks (Ixodidae) in two habitats in NE Poland. *Exp Appl*

Acarol 50, 79-91.

Pearson K., 1900, On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. Philosophical Magazine Series 5 50 (302), 157–175.

Pekova S., Vydra J., Kabickova H., Frankova S., Haugvicova R., Mazal O., Cmejla R., Hardekopf D.W., Jancuskova T., Kozak T., 2011, *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis infection identified in 2 hematologic patients: benefit of molecular techniques for rare pathogen detection. Diagn Microbiol Infect Dis 69, 266-70.

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., Mikulasek S., Elke L., Wüst G., Marth E., Strasek K., Stünzner D., Avsic-Zupanc T., 2003, Infections of wild animals with *Anaplasma phagocytophila* in Austria and the Czech Republic. Ann N Y Acad Sci 990, 103-106.

Piesman J., Spielman A., 1983, *Babesia microti* infectivity of parasites from ticks for hamsters and white-footed mice. Exp Parasitol 53, 242-248.

Poljak S., 2012, Epidemiologische Studie zu zeckenübertragenen Krankheitserregern in *Ixodes ricinus* aus bayerischen Parkanlagen [Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians-Universität. LMU München

Portillo A., Pérez-Martínez L., Santibáñez S., Santibáñez P., Palomar A.M., Oteo J.A., 2011, *Anaplasma* spp. in wild mammals and *Ixodes ricinus* from the north of Spain. Vector Borne Zoonotic Dis 11, 3-8.

Randolph S.E., 1975, Seasonal Dynamics of a Host-Parasite System: *Ixodes trianguliceps* (Acarina: Ixodidae) and its small mammal hosts. J Anim Ecol 44, 425-449.

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

Rar V.A., Epikhina T.I., Livanova N.N., Panov V.V., Doroschenko E.K., Pukhovskaya N.M., Vysochina N.P., Ivanov L.I., 2011, Genetic variability of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes persulcatus* ticks and small mammals in the Asian part of Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 1013-1021.

Reis C., Cote M., Paul R.E., Bonnet S., 2011, Questing ticks in suburban forest are infected by at least six tick-borne pathogens. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 907-916.

Remy V., Hansmann Y., De Martino S., Christmann D., Brouqui P., 2003, Human anaplasmosis presenting as atypical pneumonitis in France. *Clin Infect Dis* 37(6), 846-8.

Richter D., Endepols S., Ohlenbusch A., Eiffert H., Spielman A., Matuschka F.R., 1999, Genospecies diversity of Lyme disease spirochetes in rodent reservoirs. *Emerg Infect Dis*, 5(2), 291-6.

Richter D., Matuschka F.R., 2012, “*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis,” *Anaplasma phagocytophilum*, and lyme disease spirochetes in questing european vector ticks and in feeding ticks removed from people. *J Clin Microbiol* 50, 943–947.

Ricklefs, R.E., 1987, Community diversity: relative roles of local and regional processes. *Science* 235(4785), 167-171.

Rikihisa Y., 1991, The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clin Microbiol Rev* 4(3), 286-308.

Rikihisa Y., 2011, Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin Microbiol Rev* 24, 469-489.

Rudolf I., Golovchenko M., Sikutová S., Rudenko N., Grubhoffer L., Hubálek Z., 2005, *Babesia microti* (Piroplasmida: Babesiidae) in nymphal *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in the

Czech Republic. *Folia Parasitol (Praha)* 52(3), 274-6.

Rudzinska M.A., Spielman A., Lewengrub S., Trager W., Piesman J., 1983b, Sexuality in piroplasmids as revealed by electron microscopy in *Babesia microti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 80(10), 2966–2970.

Rudzinska M.A., Lewengrub S., Spielman A., Piesman J., 1983a, Invasion of *Babesia microti* into epithelial cells of the tick gut. *J Protozool* 30(2), 338-46.

Sainz Á., Roura X., Miró G., Estrada-Peña A., Kohn B., Harrus S., Solano-Gallego L., 2015, Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasit Vectors* 8(1), 75. [Epub ahead of print]

Salisbury A.M., Begon M., Dove W., Niklasson B., Stewart J.P., 2014, Ljungar virus is endemic in rodents in the UK. *Arch Virol* 159(3), 547-51.

Samuel W.M., 1991, Grooming by moose (*Alces alces*) infested with the winter tick, *Dermacentor albipictus* (Acari): a mechanism for premature loss of winter hair. *Can J Zool* 69(5), 1255-1260.

Sanogo Y.O., Parola P., Shpynov S., Camicas J.L., Brouqui P., Caruso G., Raoult D., 2003, Genetic diversity of bacterial agents detected in ticks removed from asymptomatic patients in northeastern Italy. *Ann N Y Acad Sci* 990, 182–190.

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., Stuenkel S., von Loewenich F.D., 2011, Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum ankA* gene clusters. *J Clin Microbiol* 49, 790-796.

Schnittger L., Rodriguez A.E., Florin-Christensen M., Morrison D.A., 2012, *Babesia*: A world emerging. *Infect Genet Evol* 12, 1788-1809.

Scholz H.C., Hubalek Z., Sedláček I., Vergnaud G., Tomaso H., Al Dahouk S., Melzer F.,

Kämpfer P., Neubauer H., Cloeckert A., Maquart M., Zygmunt M.S., Whatmore A.M., Falsen E., Bahn P., Göllner C., Pfeffer M., Huber B., Busse H.J., Nöckler K., 2008, *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. Int J Syst Evol Microbiol 58, 375-82.

Schorn S., Pfister K., Reulen H., Mahling M., Manitz J., Thiel C., Silaghi C., 2011a, Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. Ticks Tick Borne Dis 2, 196-203.

Schorn S., Pfister K., Reulen H., Mahling M., Silaghi C., 2011b, Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. Parasit Vectors 4, 135.

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.

Scorpio D.G., Akkoyunlu M., Fikrig E., Dumler J.S., 2004, CXCR2 blockade influences *Anaplasma phagocytophilum* propagation but not histopathology in the mouse model of human granulocytic anaplasmosis. Clin Diagn Lab Immunol 11, 963–968.

Senanayake S.N., Papparini A., Latimer M., Andriolo K., Dasilva A.J., Wilson H., Xayavong M.V., Collignon P.J., Jeans P., Irwin P.J., 2012, First report of human babesiosis in Australia. Med J Aust 196(5), 350-2.

Shih C.M., Liu L.P., Chung W.C., Ong S.J., Wang C.C., 1997, Human babesiosis in Taiwan: asymptomatic infection with a *Babesia microti* -like organism in a Taiwanese woman. J Clin Microbiol 35, 450–45.

Shpynov S., Fournier P.E., Rudakov N., Tarasevich I., Raoult D., 2006, Detection of members of the genera *Rickettsia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* in ticks collected in the Asiatic part of Russia. Ann N Y Acad Sci 1078, 378-83.

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(6), 972-4.

Silaghi C., Hamel D., Pfister K., Rehbein S., 2011a, *Babesia* species and co-infection with *Anaplasma phagocytophilum* in free-ranging ungulates from Tyrol (Austria). *Wien Tierärztliche Mschr-Vet Med Austria* 98, 268-274.

Silaghi C., Hamel D., Thiel C., Pfister K., Passos L.M., Rehbein S., 2011b, 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., Liebisch G., Pfister K., 2011f, Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases. *Parasit Vectors* 4, 161.

Silaghi C., Scheuerle M.C., Friche Passos L.M., Thiel C., Pfister K., 2011g, PCR detection of *Anaplasma phagocytophilum* in goat flocks in an area endemic for tick-borne fever in Switzerland. *Parasite* 18, 57-62.

Silaghi C., Skuballa J., Thiel C., Pfister K., Petney T., Pfäffle M., Taraschewski H., Passos L.M., 2012a, The European hedgehog (*Erinaceus europaeus*)-a suitable reservoir for variants of *Anaplasma phagocytophilum*? *Ticks Tick Borne Dis* 3, 49-54.

Silaghi C., Woll D., Hamel D., Pfister K., Mahling M., Pfeffer M., 2012b, *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks, ticks parasitizing rodents and the parasitized rodents - Analyzing the host-pathogen-vector interface in a metropolitan area. *Parasit Vectors* 5, 191.

Silaghi C., Woll D., Mahling M., Pfister K., Pfeffer M., 2012c, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in rodents in an area with sympatric existence of the hard ticks *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*, Germany. *Parasit Vectors* 5, 285.

Siński E., Bajer A., Welc R., Pawełczyk 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, 137-143.

Siuda K., 1991, Kleszcze (Icari: Ixodida) Polski (Monografie parazytologiczne) Polish Edition. Wydawn Nauk PWN, Polen.

Skotarczak B., Wodecka B., Cichocka A., 2002, Coexistence DNA of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from north-western Poland. Ann Agric Environ Med 9, 25-8.

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, 312-5.

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

Soleng A., Kjelland V., 2013, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in Brønnøysund in northern Norway. Ticks Tick Borne Dis 4(3), 218-21.

Sonenshine D.E., 1991, Biology of Ticks, Volume 1. Oxford University Press, New York.

Sonenshine D.E., 1993, Biology of Ticks, Volume 2. Oxford University Press, New York.

Špitalská E., Boldiš V., Derdáková M., Selyemová D., Rusňáková Tarageľová V., 2014, Rickettsial infection in *Ixodes ricinus* ticks in urban and natural habitats of Slovakia. Ticks Tick Borne Dis 5(2), 161-5.

Sréter T., Lancz Z., Széll Z., Egyed L., 2005, *Rickettsia helvetica*: an emerging tick-borne pathogen in Hungary and Europe. Orv Hetil 146(50), 2547-52.

Stadt Regensburg Umweltreferat-Gartenamt, 1996, Der Dörnbergpark in Regensburg

Parkpflegewerk Geschichte, Bestand, Zukunft, ISBN-Nr.: 3-925753-53-2.

Stresemann, E., 1989. Exkursionsfauna von Deutschland, Wirbeltiere, Volume 3. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer.

Stuen S., Granquist E.G., Silaghi C., 2013, *Anaplasma phagocytophilum*- a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol* 3, 31.

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.

Sytykiewicz H., Karbowski G., Hapunik J., Szpechciński A., Supergan-Marwicz M., Goławska S., Sprawka I., Czerniewicz P., 2012, Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* co-infections in *Ixodes ricinus* ticks in central-eastern region of Poland. *Ann Agric Environ Med* 19(1), 45-9.

Tadin A., Turk N., Korva M., Margaletić J., Beck R., Vucelja M., Habuš J., Svoboda P., Županc T.A., Henttonen H., Markotić A., 2012, Multiple co-infections of rodents with hantaviruses, *Leptospira*, and *Babesia* in Croatia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12, 388-392.

Tappe J., Strube C., 2013, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. infections in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the city of Hanover (Germany): revisited. *Ticks Tick Borne Dis* 4(5), 432-8.

Turk N., Milas Z., Margaletic J., Staresina V., Slavica A., Riquelme-Sertour N., Bellenger E., Baranton G., Postic D., 2003, Molecular characterization of *Leptospira* spp. strains isolated from small rodents in Croatia. *Epidemiol Infect* 130, 159-66.

Vannier E., Krause P. J., 2012, Human babesiosis. *N Engl J Med* 366, 2397-2407.

Vayssier-Taussat M., Le Rhun D., Buffet J.-P., Maaoui N., Galan M., Guivier E., Charbonnel N., Cosson J.-F., 2012, *Candidatus Neohhrlichia mikurensis* in bank voles, France. *Emerging*

Infect Dis 18(12), 2063-2065.

Venclikova K., Rudolf I., Mendel J., Betasova L., Hubalek Z., 2014, Rickettsiae in questing *Ixodes ricinus* ticks in the Czech Republic. Ticks Tick Borne Dis 5(2), 135-8.

Víchová B., Miterpáková M., Iglódyová A., 2014, Molecular detection of co-infections with *Anaplasma phagocytophilum* and/or *Babesia canis* in *Dirofilaria*-positive dogs from Slovakia. Vet Parasitol 203(1-2), 167-72.

von Loewenich F.D., Geissdorfer W., Disque C., Matten J., Schett G., Sakka S.G., Bogdan C., 2010, Detection of “*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis” in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant. J Clin Microbiol 48, 2630–2635.

von Loewenich F.D., Stumpf G., Baumgarten B.U., Röllinghoff M., Dumler J.S., Bogdan C., 2003, 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.

Walker D.H., Dumler J.S., 1996, Emergence of the Ehrlichioses as Human Health Problems. Emerg Infect Dis 2, 18–29.

Watkins R.A., Moshier S.E., O'Dell W.D., Pinter A.J., 1991, Splenomegaly and reticulocytosis caused by *Babesia microti* infections in natural populations of the montane vole, *Microtus montanus*. J Protozool 38, 573-6.

Weis L.M., 2014, *Dermacentor reticulatus* und *Babesia canis*: eine Feldstudie zum Vorkommen in Bayern mit anschließender digitaler Geländeanalyse [Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians-Universität. LMU München

Welc-Fałęciak R., Bajer A., Behnke J.M., Siński E., 2008, Effects of host diversity and the community composition of hard ticks (Ixodidae) on *Babesia microti* infection. Int J of Med Microbiol 298, 235–242.

Welc-Fałęciak R., Bajer A., Bednarska M., Paziewska A., Siński E., 2007, Long term monitoring of *Babesia microti* infection in BALB/c mice using nested PCR. *Ann Agric Environ Med* 14, 287-290.

Welinder-Olsson C., Kjellin E., Vaht K., Jacobsson S., Wenneras C., 2010, First case of human “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Microbiol* 48, 1956–1959.

Wielinga P.R., Fonville M., Sprong H., 2009, Persistent detection of *Babesia* EU1 and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* in the Netherlands during a 5-year surveillance: 2003-2007. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9, 119-22.

Woldehiwet Z., 1987, The effects of tick-borne fever on some functions of polymorphonuclear cells of sheep. *J Comp Pathol* 97, 481-485.

Wójcik-Fatla A., Cisak E., Chmielewska-Badora J., Zwoliński J., Buczek A., Dutkiewicz J., 2006, Prevalence of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from Lublin region (eastern Poland). *Ann Agric Environ Med* 13(2), 319-22.

Wójcik-Fatla A., Bartosik K., Buczek A., Dutkiewicz J., 2012, *Babesia microti* in adult *Dermacentor reticulatus* ticks from Eastern Poland. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12, 841-843.

Woldehiwet Z., 2008, Immune evasion and immunosuppression by *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of tick-borne fever of ruminants and human granulocytic anaplasmosis. *Vet J* 175, 37-44.

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

Yabsley M.J., Shock B.C., 2013, Natural history of Zoonotic *Babesia*: Role of wildlife reservoirs. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 2, 18–31.

Žele D., Avberšek J., Gruntar I., Očepek M., Vengušt G., 2012, Evidence of *Anaplasma*

phagocytophilum in game animals from Slovenia. Acta Vet Hung 60, 441-448.

Zhan L., Cao W.C., de Vlas S., Xie S.Y., Zhang P.H., Wu X.M., Dumler J.S., Yang H., Richardus J.H., Habbema J.D., 2008, A newly discovered *Anaplasma phagocytophilum* variant in rodents from southeastern China. Vector Borne Zoonotic Dis 8(3), 369-80.

Zhan L., Cao W.C., Chu C.-Y., Jiang B.-G., Zhang F., Liu W., Dumler J.S., Wu X.-M., Zuo S.-Q., Zhang P.-H., Huang H.-N., Zhao Q.-M., Jia N., Yang H., Richardus J.H., Habbema J.D., 2009, Tick-borne Agents in Rodents, China, 2004–2006. Emerg Infect Dis 15(12), 1904–1908.

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.

Zygner W., Górski P., Wedrychowicz H., 2009, New localities of *Dermacentor reticulatus* tick (vector of *Babesia canis canis*) in central and eastern Poland. Pol J Vet Sci 12(4), 549-55.

Zygner W., Jaros S., Wedrychowicz H., 2008, Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia afzelii*, and *Anaplasma phagocytophilum* infection in hard ticks removed from dogs in Warsaw (central Poland). Vet Parasitol 153(1-2), 139-42.

IX. ANHANG

1. Material

1.1. Geräte

Tissue Lyser	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
Thermomixer®comfort	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Maxwell® 16 System	(Promega, Mannheim, Deutschland)
Nano Drop ND-1000	(PiqLab Erlangen, Deutschland)
AB-7500-Real-Time PCR Gerät	(Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland)
AB-7500 FAST Real-Time PCR System	(Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland)
Thermocycler Mastercycler® gradient	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Gelkammern verschiedener Größen	(PiqLab Erlangen, Deutschland)
Geldokumentationssystem (UV-Licht)	(PiqLab Erlangen, Deutschland)

1.2. Kits

Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit	(Promega, Mannheim, Deutschland)
QIAquick PCR Purification Kit	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
SYBR® Green PCR Master Mix 2x	(Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland)
Taq Man® fast Universal PCR Mastermix 2x	(Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland)
HotStarTaqPlus DNA Polymerase Kit	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
Expand High Fidelity PLUS PCR System	(Roche, Mannheim, Deutschland)

1.3. Nukleotide

dNTP mix, PCR Grade	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
---------------------	-------------------------------

1.4. Primer

BJ1, BN2	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany)
ApMsp2f, ApMsp2r	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany)
ApMsp2p (FAM-TMR)	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany)
ge3a, ge10r	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany)
NMikGroEL F2	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany)
NMikGroEL rev1	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany)
NMikGroEL rev2	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany)
NMikGroEL-P2a	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany)
L14816, H15173	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany)
16S+1; 16S-1	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany)

1.5. Chemikalien

PBS	(Sigma-Aldrich® Chemie, München, Deutschland)
Molekularbiologisch reines H ₂ O	(Sigma-Aldrich® Chemie, München, Deutschland)
Ethanol, reinst	(Roth®, Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol vergällt	(Roth®, Karlsruhe, Deutschland)
Sodium Acetat Puffer	(Sigma-Aldrich® Chemie, München, Deutschland)
Top Vision Agarose	(Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)
TAE Puffer 50x	(Qiagen, Hilden, Germany)
TBE Puffer 10x	(Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)
Gel Red TM Nucleid Acid stain,	(Biotium Hayward, USA)

10.000x in Wasser

Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)

6x DNA Loading Dye (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)

2. Abbildungen

Abb. 1 Dörnberg Park, urbaner Standort

Abb. 2 Angelberger Forst, silvatischer Standort

Abb. 3 Cospudener See, renaturierter Standort

Abb. 4 a) aufgestellte Lebendfallen (Sherman Traps) b) Lebendfallen mit Köder

Abb. 5 a) Sektion einer Rötelmaus b) entnommene Milz einer Rötelmaus

3. Tabellen

Tabelle 1 Vorkommen von *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in wirtssuchenden *Ixodes ricinus* Zecken aus unterschiedlichen Habitaten in Europa (Auszug)

Tabelle 2 Vorkommen von *Anaplasma phagocytophilum* in wirtssuchenden *Ixodes ricinus* Zecken von unterschiedlichen Habitaten in Europa (Auszug)

Tabelle 3 Vorkommen von *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* Zecken von unterschiedlichen Habitaten und Tiere in Europa (Auszug)

Tabelle 4 *Ixodes ricinus* DNA Proben, die aus Vorgängerstudien aus den Jahren 2009 bis 2013 vom Standort R1 bzw. aus den Jahren 2011 and 2012 vom Standort T verfügbar waren

Tabelle 5 Verwendete Primer zur Ermittlung von Pathogen-DNA bzw. zur Bestimmung von Mäuse- und Zeckenspezies in Mäuse bzw. Zeckenproben

Tabelle 6 Reagenzienmix zur Differenzierung der unterschiedlichen Mäusearten mittels konventioneller PCR

Tabelle 7 Thermoprofil der PCR zur Differenzierung der unterschiedlichen Mäusearten

Tabelle 8 Reagenzienmix zur Differenzierung der unterschiedlichen Zeckenarten mittels konventioneller PCR

Tabelle 9 Thermoprofil der PCR zur Differenzierung der unterschiedlichen Zeckenarten

Tabelle 10 Übersicht der auf CNM, *A. phagocytophilum* und *B. microti* untersuchten Proben

Tabelle 11 Reagenzienmix zur Detektion von *Babesia* spp. mittels konventioneller PCR

Tabelle 12 Thermoprofil der PCR zur Detektion von *Babesia* spp.

Tabelle 13 Reagenzienmix zur Detektion von *A. phagocytophilum* in Zecken mittels Real-Time PCR

Tabelle 14 Thermoprofil der PCR zur Detektion von *A. phagocytophilum* in Zecken

Tabelle 15 Reagenzienmix zur Detektion von *A. phagocytophilum* in Kleinsäufern mittels Real-Time PCR

Tabelle 16 Thermoprofil der PCR zur Detektion von *A. phagocytophilum* in Kleinsäufern

Tabelle 17 Reagenzienmix zur Detektion von *A. phagocytophilum* mittels nested-PCR

Tabelle 18 Thermoprofil der PCR zur Detektion von *A. phagocytophilum* mittels nested-PCR

Tabelle 19 Reagenzienmix zur Detektion von *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* mittels Real-Time PCR

Tabelle 20 Thermoprofil der PCR zur Detektion von *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*

Tabelle 21 Anzahl *Babesia microti*-, *Anaplasma phagocytophilum*- und CNM-positiver bzw. untersuchter Kleinsäuger pro Jahr und Monat am urbanen (U), silvatischen (T) und renaturierten Standort (R)

Tabelle 21 Anzahl *Babesia microti*-, *Anaplasma phagocytophilum*- und CNM-positiver bzw. untersuchter Kleinsäuger pro Jahr und Monat am urbanen (U), silvatischen (T) und renaturierten Standort (R)

Standort	Jahr	Monat	Anzahl positiver /untersuchter Kleinsäuger auf CNM	Anzahl positiver /untersuchter Kleinsäuger auf <i>A.</i> <i>phagocytophilum</i>	Anzahl positiver /untersuchter Kleinsäuger auf <i>B. microti</i>	Gesamt*
U	2012	Juli	1/4	0/4	0/4	1/4
		August	0/10	0/10	0/10	0/10
		September	0/4	0/4	0/4	0/4
		Oktober	0/4	0/4	0/4	0/4
T	2012	Juli	1/81	1/81	1/81	3/81
		August	6/64	0/64	2/64	8/64
		September	7/39	0/39	4/39	11/39
		Oktober	2/32	0/32	2/32	4/32
S	2012	März	0/16	0/16	0/16	0/16
		April	10/41	1/41	0/41	11/41
		Mai	13/73	0/73	1/73	14/73
		Juni	15/78	2/78	0/78	17/78
		Juli	28/86	1/86	0/86	29/86
		August	27/67	0/67	1/67	28/67
		September	16/47	1/47	0/47	16/47
		Oktober	10/43	1/43	0/43	10/43
U	2013	April	0/3	0/3	0/3	0/3
		Mai	0/2	0/2	0/2	0/2
		Juni	0/4	1/4	0/4	1/4
		Juli	0/5	1/5	0/5	1/5
		August	0/0	0/0	0/0	0/0
T	2013	April	0/3	0/3	0/3	0/3
		Mai	0/5	0/5	0/5	0/5
		Juni	1/3	0/3	1/3	2/3
		Juli	3/6	0/6	1/6	4/6
		August	4/9	0/9	0/9	4/9
S	2013	Januar	1/4	0/4	0/4	1/4
		April	0/5	0/5	0/5	0/5
		Mai	3/6	0/6	0/6	3/6
		Juni	5/8	0/8	0/8	5/8
		Juli	12/18	0/18	0/18	12/18
		August	5/9	0/9	0/9	5/9
Gesamt			181/631	7/631	13/631	201/631

*Doppelinfectionen pro Individuum nicht berücksichtigt

X. DANKSAGUNG

In diesem Kapitel möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Entstehung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Kurt Pfister bedanken, der mir das Thema dieser Doktorarbeit vorgeschlagen und mir eine Stelle am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie eröffnet hat. Mein besonderer Dank geht an meine Doktormutter und Betreuerin Frau PD Dr. Cornelia Silaghi, die mir beruflich vieles ermöglicht hat und mich mit ihrer intensiven Betreuung, ihren detaillierten Korrekturen und ihrer herzlichen Art auf meinem Weg durch die Doktorarbeit begleitet hat. Ein großes Dankeschön geht außerdem an Prof. Dr. Martin Pfeffer, nicht nur für das Angebot meinen Datensatz um die in Sachsen gefangenen Mäuse zu erweitern, sondern vielmehr für die überraschende Eröffnung einer Stelle an seinem Institut, an dem er mich herzlich aufgenommen hat, und für seine wegweisenden, konstruktiven Korrekturen und Beratungen bezüglich unserer Publikationen.

Vielen lieben Dank an Claudia Thiel und Tim Tiedemann, die mir im Labor und auch in schweren Zeiten zur Seite standen und die mir mit Fleiß und Geduld bei den Mäuse-Sektionen und der Feldarbeit geholfen haben. Herzlichen Dank auch an Dietlinde Woll, Carolin Karnath, Anneliese Balling und alle weiteren Helfern, die mich hinsichtlich der Feldarbeit in Sachsen und den damit verbundenen Mäusesektionen sehr entlastet haben. Für ihre Unterstützung bei der Feldarbeit und bei der Bestimmung von Ektoparasiten möchte ich mich bei Uwe Birett, Sarah Wagner, Olcay Hekimoglu und Zuzana Svitalkova bedanken. Ich bedanke mich außerdem bei Sabine Poljak, Evelyn Overzier und Andrea Gomez-Chamorro für das Bereitstellen ihrer Zeckenproben für meine weiteren Untersuchungen.

Ich bedanke mich bei dem durch die Europäische Union finanzierten Projekt EDENext und beim Umweltbundesamt für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit. Last but not least, bedanke ich mich an dieser Stelle ganz besonders bei meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden, die in den letzten Jahren des Studium und der Doktorarbeit auch in schweren Zeiten für mich da waren und mich immer unterstützt haben.