

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

Vorkommen von *Anaplasma phagocytophilum* und *Babesia*
spp. in Rehwild (*Capreolus capreolus*), Damwild (*Dama*
dama) und Muffelwild (*Ovis musimon*) in Deutschland

von Melanie Christin König, geb. Kauffmann

aus Gräfelfing

München 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Departement 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. Reinhard K. Straubinger, PhD

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Cornelia Silaghi

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Bianka Schulz

Tag der Promotion: 29. Juli 2017

Für Andreas

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	4
1.	Pathogene	4
1.1.	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	4
1.1.1.	Taxonomie.....	4
1.1.2.	Vektor.....	5
1.1.3.	Historie	6
1.1.4.	Klinik.....	7
1.1.5.	Reservoirwirte	8
1.1.6.	Genetische Variabilität.....	12
1.2.	<i>Babesia</i> spp.	13
1.2.1.	Taxonomie.....	13
1.2.2.	Entwicklungszyklus, Vektor	14
1.2.3.	Historisches	16
1.2.4.	Klinik.....	16
1.2.5.	<i>Babesia</i> spp. in Wildwiederkäuern.....	18
III.	MATERIAL UND METHODEN	20
1.	Proben	20
2.	DNA Extraktion.....	22
3.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	22
3.1.	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	22
3.1.1.	Real-time-PCR	22
3.1.2.	Nested PCR	23
3.2.	<i>Babesia</i> spp.	24
3.3.	<i>Theileria</i> spp.....	24
4.	Agarose-Gelelektrophorese	25
5.	Sequenzanalyse	26
6.	Statistik.....	26
IV.	ERGEBNISSE	28
1.	Publikation.....	28
V.	DISKUSSION	58

1.	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	58
2.	<i>Babesia</i> spp.	62
3.	<i>Theileria</i> spp.	65
4.	Coinfektionen	66
VI.	SCHLUSSFOLGERUNG	68
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	69
VIII.	SUMMARY	71
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	73
X.	ANHANG	95
1.	Abbildungen	95
2.	Tabellen	95
3.	Material	96
3.1.	Geräte	96
3.2.	Kits	96
3.3.	Nukleotide, Primer	96
3.4.	Chemikalien	97
XI.	DANKSAGUNG	98

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Anaplasma	mM	Milimolar
Abb.	Abbildung	N	Anzahl
B.	Babesia	NCBI	National Center for Biotechnology Information
bp	Basenpaar	ng	Nanogramm
BLAST	Basic local alignment search tool	Nr./no.	Nummer
bzw.	beziehungsweise	nos.	Nummern
°C	Grad Celcius	PCR	Polymerase-Ketten- Reaktion (englisch: Polymerase chain reaction)
ca.	Cirka	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
CGA	Canine granulozytäre Anaplasrose	sek	Sekunde
cm ³	Kubikzentimeter	sp.	Species
Ct-Wert	Schwellenwert-Zyklus	spp.	species (Plural)
d.h.	das heißt	Tab.	Tabelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Taq	Thermus aquaticus
dNTP	Desoxyribonukleosid- triphosphate	TBF	Tick-borne-fever
EGA	Equine granulozytäre Anaplasrose	U	Einheit (englisch: unit)
H ₂ O	Wasser	UV	Ultraviolett
HGA	Humane granulozytäre Anaplasrose		
I.	Ixodes		
mSP	Oberflächenprotein (englisch: major surface protein)		
µl	Mikroliter		
µm	Mikrometer		
µM	Mikromolar		
min/min.	Minute		
mm	Millimeter		
mm ³	Kubikmillimeter		

I. EINLEITUNG

Das Zusammenspiel von Pathogenen, Zecken und deren Wirten ist für die Verbreitung von zecken-übertragenen Krankheiten verantwortlich. Einige Wirte ermöglichen den Krankheitserregern eine Weiterentwicklung und Vermehrung ohne selbst Schaden zu nehmen oder Krankheitssymptome zu entwickeln und gelten somit als Reservoirwirte.

In Mitteleuropa ist der gemeine Holzbock *Ixodes ricinus* die am weitesten verbreitete Schildzeckenart. Diese ist unter anderem als Vektor für *Anaplasma phagocytophilum* und *Babesia* spp. bekannt, die als sogenannte „emerging pathogens“ gelten. Das heißt, sie fallen durch ein zunehmendes Auftreten auf und betreffen als Zoonoseerreger sowohl Tiere als auch den Menschen. Beim Menschen können sie zu Erkrankungen führen, die im Schweregrad stark variieren. Auch bei Haus- und Nutztieren sind unterschiedliche schwere Krankheitsverläufe bekannt, wobei bei letzteren eine Erkrankung fast immer mit wirtschaftlichen Einbußen einhergeht (Deplazes et al., 2012; Homer et al., 2000; Stuen et al., 2013a; Woldehiwet, 2010).

Babesien sowie *A. phagocytophilum* wurden bereits in Wildtieren nachgewiesen. Die Bandbreite reicht dabei bei *A. phagocytophilum* von kleinen Nagetieren über Wildwiederkäuer bis hin zu großen Raubtieren wie dem Braunbär (Obiegala et al., 2014; Stuen et al., 2013a; Vichova et al., 2010). Aufgrund der vielen Babesienarten ist auch die Bandbreite unterschiedlicher Wirte entsprechend groß. Von den über 100 bekannten Arten wurden sechs bereits in europäischen Wildwiederkäuern molekularbiologisch nachgewiesen: *Babesia capreoli*, *Babesia divergens*, *Babesia bigemina*, *Babesia motasi*, *Babesia ovis* und *Babesia venatorum* (Synonym: *Babesia* sp. EU1). Zusätzlich sind auch Varianten mit geringen genetischen Abweichungen wie *Babesia odocoilei*-like, *Babesia* sp. MO1 und *Babesia* sp. CH1 in früheren Studien erwähnt (Duh et al., 2005; Enigk und Friedhoff, 1962b; Homer et al., 2000; Michel et al., 2014; Overzier et al., 2013a; Silaghi et al., 2011a; Tampieri et al., 2008; Zanet et al., 2014).

Bei früheren Studien fielen dabei zum Teil sehr hohe Prävalenzen in Wildwiederkäuern auf, so dass einige Autoren diese als mögliche Reservoirwirte für einige der oben genannten Babesienarten sowie für *A. phagocytophilum*

vorschlugen (Alberdi et al., 2000; Overzier et al., 2013a; Silaghi et al., 2011a; Zintl et al., 2003). Das Vorkommen schwankt jedoch stark je nach Erreger- und Wildwiederkäuerart. Beispielsweise in Italien wurde für *A. phagocytophilum* eine Prävalenz für Rehe von 54,2% nachgewiesen; bei Damwild und Muffelwild aus der gleichen Region wurde der Erreger nicht gefunden. Die Gründe hierfür sind weitestgehend ungeklärt. Auch fällt in Studien über *A. phagocytophilum* auf, dass diese Tierarten im Vergleich relativ selten Krankheitssymptome zeigen, was zur Diskussion führt, ob diese Tiere nicht eher Träger von weniger pathogenen Varianten der Erreger sind, als denjenigen Varianten, die für die ansteigende Zahl an Krankheitsfällen verantwortlich sind (Ebani et al., 2015; Scharf et al., 2011; Silaghi et al., 2011a).

Über die Situation in Deutschland bezüglich *A. phagocytophilum* und *Babesia* spp. in Wildwiederkäuern ist wenig bekannt, da bisher großflächigere Untersuchungen ausstehen. Einige Studien aus Süddeutschland und den angrenzenden Ländern Österreich und Schweiz lassen jedoch vermuten, dass beide Pathogene auch in Deutschland weit verbreitet sind. Die Prävalenzen für Rehwild betragen zwischen 18,4% in der Schweiz und 98,9% in Deutschland für *A. phagocytophilum* und zwischen 23,9% in der Schweiz und 89,5% in Deutschland für *Babesia* spp. Dabei wurden *B. capreoli*, *B. microti* und *B. venatorum* nachgewiesen (Liz et al., 2000; Michel et al., 2014; Overzier et al., 2013a; Silaghi et al., 2011a; Silaghi et al., 2011b). Es ist auch noch weitgehend unbekannt, welche genetischen Varianten von *A. phagocytophilum* bzw. welche Babesienarten hauptsächlich in Deutschland vorkommen. Diese Studie soll daher weitere Informationen zur Verbreitung von *A. phagocytophilum* und *Babesia* spp. in deutschen Rehwildbeständen liefern und zusätzlich auch bisher weniger beachtete Wildwiederkäuerarten wie Muffelwild und Damwild einschließen.

Daher waren die Ziele dieser Studie:

- (i) Die Prävalenzen von *A. phagocytophilum* und *Babesia* spp. in sympatrischen Rehwild-, und Mufflonbeständen sowie Damwild in Deutschland durch PCR-Untersuchungen zu ermitteln;
- (ii) Das Vorkommen unterschiedlicher genetischer Varianten von *A. phagocytophilum* anhand des partiellen *16S rRNA*-Gens aufzudecken und gegebenenfalls Assoziationen zu den untersuchten Wildtierarten zu zuordnen;
- (iii) Das Auftreten unterschiedlicher *Babesia* spp. und deren Assoziation zu den untersuchten Wildtierarten zu untersuchen.

Die Ergebnisse dieser Studie sollen den aktuellen Wissensstand zur Verbreitung von *A. phagocytophilum* und Babesien in Wildwiederkäuern in Deutschland erweitern, mögliche Reservoirwirte aufdecken und das Risikopotential für Mensch und Tier bezüglich der vorkommenden Varianten bzw. Erregerarten besser einschätzen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Pathogene

1.1. *Anaplasma phagocytophilum*

1.1.1. Taxonomie

Bei *Anaplasma phagocytophilum* handelt es sich um ein gramnegatives, pleomorphes, meist kokkoides bis ellipsoides α -Proteobakterium, das in eukaryotischen Wirtszellen parasitiert und sich während der Vermehrung in den zytoplasmatischen Vakuolen als mikroskopisch sichtbare Makrokolonien darstellt. Diese sog. Morulae erreichen normalerweise in Zellen von Säugetieren eine Größe von 1,5-2,5 μm im Durchmesser und zeigen sich in neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie in Monozyten (Dumler et al., 2001; Rikihisa, 1991; Woldehiwet, 2010).

Nach einer Neuordnung der Ordnung der Rickettsiales wurden die früher als *Ehrlichia phagocytophyla*, *Ehrlichia equi* und als Erreger der humanen granulozytären Ehrlichiose bezeichneten Spezies unter dem Namen *Anaplasma phagocytophilum* zusammengefasst (Dumler et al., 2001) (Abb. 1).

Diese Zusammenfassung basierte auf Ähnlichkeiten in einer *16S rRNA*-Teilnukleotidsequenz. Verschiedene nachfolgende Studien zeigten jedoch auf molekularbiologischer Ebene durch Untersuchung unterschiedlicher Gene wie *msp4*, *p44/msp2*, *ankA*, *groEL* und *16S rRNA* eine Heterogenität des Erregers auf, die sich auch in der geographischen Verbreitung einzelner genetischer Varianten, sowie möglicherweise in deren Pathogenität und in ihrem Tropismus zu Vektoren und Wirten widerspiegelt (Alberti et al., 2005; de la Fuente et al., 2005a; Milutinovic et al., 2008; Rymaszewska, 2008; Scharf et al., 2011; Silaghi et al., 2011b; Stuen et al., 2003).

Stamm: Proteobacteria
Klasse: Alphaproteobacteria
Ordnung: Rickettsiales
Familie: Anaplasmataceae
Gattung: <i>Anaplasma</i>
Art: <i>Anaplasma phagocytophilum</i>

Abbildung 1: Taxonomische Einordnung von *Anaplasma phagocytophilum* nach (Dumler et al., 2001)

1.1.2. Vektor

Überträger von *A. phagocytophilum* sind Schildzecken. Während in den USA vor allem *Ixodes scapularis* und *Ixodes pacificus* als Vektoren bekannt sind, wurde in Asien der Erreger überwiegend in *Ixodes persulcatus* nachgewiesen. In Europa wird *A. phagocytophilum* vor allem von *Ixodes ricinus* übertragen (Parola et al., 2005; Woldehiwet, 2010). Die molekularbiologisch nachgewiesenen Prävalenzen in diesen Zeckenarten schwanken stark von 0 bis 50% (Tab. 1).

Tabelle 1: Mittels PCR nachgewiesene Prävalenzintervalle von *Anaplasma phagocytophilum* in den häufigsten Zeckenarten (Auswahl)

Zeckenart	Prävalenzintervall in %	Referenz
<i>Ixodes scapularis</i>	0,2-50,0	(Magnarelli et al., 1995; Moreno et al., 2006; Walk et al., 2009)
<i>I. pacificus</i>	0,8-9,9	(Barlough et al., 1997; Lane et al., 2001)
<i>I. persulcatus</i>	0,8-21,6	(Cao et al., 2000; Ybanez et al., 2012)
<i>I. ricinus</i>	0,3-33,9	(Alberdi et al., 1998; Christova et al., 2001; Cotte et al., 2010)

In Großbritannien ist ein Nischenzyklus, der kleine Nagetiere und die nagetierspezifische Schildzecke *Ixodes trianguliceps* beinhaltet, bekannt. Da in den Nagern trotz mehrerer Untersuchungen der Erreger meist nur einmalig nachweisbar ist und danach anscheinend in den Nagetieren eliminiert wird, schlägt der Autor die Zeckenart (*I. trianguliceps*) als mögliches Reservoir vor (Bown et al., 2003).

Weitere wirtssuchende Zeckenarten, in denen DNA von *A. phagocytophilum* nachgewiesen wurde, sind in Europa *Dermacentor reticulatus*, *Haemaphysalis concinna*, und *Ixodes ventralis* und bei gesaugten, von Wirten abgesammelten Zecken zusätzlich *Ixodes hexagonus* (Paulauskas et al., 2012; Santos et al., 2004; Silaghi et al., 2012a; Tomanovic et al., 2013). Allerdings sind deren Fähigkeiten als kompetente Vektoren, sowie deren Rolle im Entwicklungszyklus von *A. phagocytophilum* bisher nur unzureichend untersucht (Stuenkel et al., 2013a).

Für *A. phagocytophilum* wurde eine transstadiale Übertragung nachgewiesen, eine transovarielle Übertragung wird jedoch ausgeschlossen oder als nicht effektiv angesehen (Ogden et al., 1998). In einer experimentellen Studie konnte jedoch für *Dermacentor albipictus* in Amerika eine transovarielle Übertragung nachgewiesen werden (Baldrige et al., 2009).

Die Prävalenzen in Zecken mit bis 50,0% stellen hier die Maximalwerte dar (Tab. 1). Die durchschnittlichen Prävalenzen liegen deutlich niedriger. Diese eher niedrigen Prävalenzen in Zecken sprechen für die Theorie anderer Autoren, die verschiedene Wildtiere wie das Reh (*Capreolus capreolus*) als mögliche Reservoirwirte vorschlagen (Alberdi et al., 2000; Corrain et al., 2012; Ebani et al., 2015; Palomar et al., 2014; Silaghi et al., 2011a; Silaghi et al., 2014).

1.1.3. Historie

Im Jahr 1932 wurde erstmals eine damals neue Erkrankung beim Wiederkäuer entdeckt und als Zeckenbissfieber bezeichnet (McLeod, 1932). *Anaplasma phagocytophilum* wurde unter dem Namen *Ehrlichia phagocytophila* 1940 erstmals als Auslöser des Zeckenbissfiebers (TBF) von Gordon et al. beschrieben (zitiert in (Woldehiwet, 2010)). Seitdem wurden immer wieder klinische Fälle in verschiedenen Teilen Europas bekannt (Aktas und Ozubek, 2015; Juste et al., 1989; Nieder et al., 2012; Pfister et al., 1987; Tuomi, 1967; Woldehiwet, 2010).

Dagegen trat die Equine granulozytäre Anaplasiose (EGA) zunächst nur in den USA auf und wurde 1969 in Kalifornien erstmals beschrieben (Gribble, 1969). Später kam sie sowohl in Nordamerika als auch in Europa vor (Woldehiwet, 2010).

Die canine Form (Canine Granulozytäre Anaplasiose, CGA) wurde ebenfalls erstmals in den USA beschrieben. Sie fand 1982 ihren Eingang in die Literatur und wird unterdessen auch in Europa beschrieben (Engvall und Egenvall, 2002; Madewell und Gribble, 1982).

Klinische Fälle beim Menschen (Humane Granulozytäre Anaplasiose, HGA) sind erst seit 1994 bekannt, davor ging man davon aus, dass der Mensch nicht betroffen ist. In Europa scheint im Gegensatz zu den USA die Erkrankung eher selten zu sein, da bis 2010 weniger als 100 Fälle in Europa beschrieben sind und in den USA zwischen 1995 und 2015 annähernd 16000 Fälle. Aufgrund der fehlenden Meldepflicht ist die genaue Zahl von Infektionen in Europa jedoch unklar. Einige Autoren geben sie wie in den USA als dritthäufigste zeckenübertragene Krankheit an (Bakken und Dumler, 2015; Bakken et al., 1994; Chen et al., 1994; Doudier et al., 2010; Dumler, 2012).

1.1.4. Klinik

Beim Wiederkäuer äußert sich eine Infektion als fieberhafte Allgemeinerkrankung der Ziegen, Schafe und Rinder, die vor allem in Nord- und Westeuropa auftritt. Der Verlauf variiert von klinisch inapparent bis zu schweren fieberhaften Infektionen, die mit schweren Blutungen, Aborten und Sekundärinfektionen einhergehen können. Eine klinische Manifestation macht sich meist 4-7 Tage nach Infektion durch hohes Fieber bemerkbar. Dieses kann bis zu 14 Tage anhalten. Begleitet wird es meist von Symptomen wie Apathie, Appetitverlust, reduzierten Allgemeinbefinden, und respiratorischen Symptomen wie zum Beispiel Husten sowie Diarrhoe. Labordiagnostisch lassen sich Leukopenie und Thrombozytopenie, sowie zum Teil auch Erythrozytopenie nachweisen. Während der Fieberphase können Morulae in den Granulozyten und im weiteren Verlauf auch in den Monozyten nachgewiesen werden. Wirtschaftlich macht sich vor allem der teils höchstgradige Rückgang der Milchleistung bemerkbar (Pusterla und Braun, 1997; Pusterla et al., 1997; Woldehiwet, 2010).

Pferde erkranken vor allem in Nordamerika und in Nordeuropa und als Symptome treten Fieber, Abgeschlagenheit, Appetitverlust, Leukopenie und Thrombozytopenie auf, oft kommt es auch zu Ödemen an den Gliedmaßen und Ataxien. Zusätzlich kommt es häufig zu Sekundärinfektionen (Engvall und Egenvall, 2002).

Die Erkrankung der Hunde ähnelt stark dem Krankheitsbild beim Pferd. Auffälligste Anzeichen sind Fieber und Mattigkeit, gefolgt von Appetitlosigkeit. Hunde entwickeln häufig Lahmheiten, gastrointestinale, sowie ZNS-Symptome. Bei einigen Fällen wurden Petechien und ikterische Verfärbungen auf den mukösen Schleimhäuten sichtbar (Carrade et al., 2009; Dondi et al., 2014; Engvall und Egenvall, 2002; Kohn et al., 2008; Silaghi et al., 2011c).

Infektionen beim Menschen treten vor allem in Nordamerika und zum Teil in Europa (beispielsweise Slowenien, Niederlande, Spanien, Schweden und Polen) auf, zunehmend aber auch in Asien (Dumler, 2012; Zhang et al., 2008). Leitsymptome sind grippeähnliche Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen, Muskelschmerzen und allgemeines Unwohlsein. Labordiagnostisch zeigen sich gleichzeitig Leukopenie, Thrombozytopenie, Anämie und es kann eine Beeinträchtigung der Leber auftreten. Obwohl sehr schwere Krankheitsverläufe vorkommen, die einen Krankenhausaufenthalt notwendig machen, Intensivmedizin erfordern oder sogar zum Tod führen können, zeigt sich meist nur eine subklinische oder milde Erkrankung (Bakken et al., 1994; Bakken und Dumler, 2008; Blanco und Oteo, 2002; Dumler, 2012; Severo et al., 2012).

1.1.5. Reservoirwirte

Da der Erreger in der Zecke zum Teil nur mit niedrigen Prävalenzen vertreten ist und auch eine Weiterverbreitung in der Zeckenpopulation selbst aufgrund mangelnder transovarier Übertragung eingeschränkt ist, benötigt *A. phagocytophilum* einen Reservoirwirt (Doudier et al., 2010).

Als mögliche Reservoirwirte werden verschiedene kleine Nagetiere wie die Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*), die Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*) oder die Wühlmaus (*Myodes glareolus*) vorgeschlagen (Liz et al., 2000). Ebenso könnten kleine insektenfressende Säugetiere wie die Spitzmaus (*Sorex araneus*) oder der europäische Igel (*Erinaceus europaeus*) in Frage kommen (Bown et al., 2011; Silaghi et al., 2012a). Auch in anderen Säugetieren wie dem Wildschwein

(*Sus scrofa*), Füchsen (*Vulpes vulpes*) oder Braunbären (*Ursus arctos*) und einigen Vogelarten wurde *A. phagocytophilum* nachgewiesen (De La Fuente et al., 2005b; Hulinska et al., 2004; Silaghi et al., 2014; Vichova et al., 2010). Dennoch ist deren Rolle als mögliche Reservoirwirte unklar. Mehrere Autoren schlagen Wildwiederkäuer wie das Rehwild (*Capreolus capreolus*) oder das Rotwild (*Cervus elaphus*) als mögliche Reservoirwirte vor (Alberdi et al., 2000; Corrain et al., 2012; Ebani et al., 2015; Liz et al., 2002; Palomar et al., 2014; Silaghi et al., 2014; Stefanidesova et al., 2008; Stuen, 2007; Stuen et al., 2013a).

Über den klinischen Verlauf der Granulozytären Anaplasrose in Wildwiederkäuern ist wenig bekannt. Im Allgemeinen geht man davon aus, dass milde Verläufe vorliegen (Alberdi et al., 2000). Meist befinden sich untersuchte Tiere in einem guten Allgemeinzustand ohne Krankheitsanzeichen. Diese Tatsache stützt die Theorie, dass sie gut als Reservoir geeignet wären. Auch die zum Teil sehr hohen Prävalenzen von bis zu 98,8% (Rehwild in Deutschland), die mit PCR ermittelt wurden, stützen diese Theorie. Andere Autoren sehen Gründe hierfür in der möglicherweise mangelnden Pathogenität der vorkommenden Varianten (Ebani et al., 2015; Overzier et al., 2013a; Scharf et al., 2011; Silaghi et al., 2011a). Dennoch liegen einige Fallberichte aus Norwegen vor, denen zu Folge bei drei mit schweren klinischen Symptomen aufgefundenen Reh- bzw. Elchkälbern eine *A. phagocytophilum*-Infektion bestätigt wurde. Bei zwei dieser Tiere wurden allerdings zusätzlich noch weitere Infektionen mit anderen Erregern nachgewiesen (Jenkins et al., 2001; Stuen et al., 2001a; Stuen et al., 2006).

Experimentelle Infektionsversuche mit Rentieren (*Rangifer tarandus tarandus*) und Rotwild zeigten, dass ein unterschiedlicher klinischer Verlauf bei den beiden Tierarten besteht. Während Rentiere schwere klinische Symptome entwickeln und ein Tier im Laufe des Versuchs verstarb, zeigt sich beim Rotwild eine subklinische persistierende Infektion, bei der Antikörper gegen *A. phagocytophilum* und die DNA des Erregers nachweisbar waren (Stuen, 1996; Stuen et al., 2001b). Ein weiterer Infektionsversuch mit Weißwedelhirschen (*Odocoileus virginianus*) in den USA zeigte ähnliche Ergebnisse wie der oben erwähnte Rotwildversuch: Antikörper und *A. phagocytophilum*-DNA waren nachweisbar, aber es entwickelten sich keine klinischen Symptome (Tate et al., 2005).

Anaplasma phagocytophilum wurde bereits in zahlreichen Wildwiederkäuerarten vor allem molekularbiologisch nachgewiesen. Dazu gehören zum Beispiel Rehwild, Elch (*Alces alces*), Rotwild, Damwild (*Dama dama*), europäisches Bison (*Bison bonasus*), Steinböcke (*Capra ibex*) und Gämsen (*Rupicapra rupicapra*) (de la Fuente et al., 2008; Granquist et al., 2014; Karbowski et al., 2015; Silaghi et al., 2011a; Veronesi et al., 2010).

Eine unterschiedliche Empfänglichkeit der verschiedenen Wildwiederkäuerarten lassen mehrere Studien vermuten, die signifikante Unterschiede in den Prävalenzen mit *A. phagocytophilum* der einzelnen Arten festgestellt haben (Liz et al., 2002; Robinson et al., 2009; Stuen et al., 2002; Zeman und Pecha, 2008).

Die Prävalenzen für *A. phagocytophilum* bei den in dieser Studie untersuchten Wildwiederkäuerarten in Europa schwanken in vorangegangenen Studien stark zwischen 1,5% in Damwild in Polen (Hapunik et al., 2011) und 98,9% in Rehwild in Deutschland (Overzier et al., 2013a). Diese Werte wurden durch PCR-Untersuchungen ermittelt (Tab. 2). Für serologische Untersuchungen liegen die Ergebnisse mit bis zu 100% in Rehwild, Rotwild, Damwild und Muffelwild nochmals höher (Zeman und Pecha, 2008).

Ein weiterer Grund für diese Schwankungen wird in der Nutzung unterschiedlicher Habitate der Tiere vermutet. Die Besetzung unterschiedlicher Lebensräume führt eine Schwankung in der Zeckenexposition mit sich, und damit des Infektionsrisikos (Kiffner et al., 2011; Vor et al., 2010; Walker et al., 2001).

Eine Geschlechtsprädisposition ist bisher nicht beschrieben, eine unterschiedliche Empfänglichkeit aufgrund des Alters wird verschieden dargestellt. Während einige Studien hier keinen Unterschiede feststellen konnten, wird in anderen Untersuchungen gezeigt, dass Tiere, die älter als drei Jahre sind, signifikant weniger Infektionen aufweisen (Polin et al., 2004; Silaghi et al., 2011a; Skarphedinsson et al., 2005).

Tabelle 2: Mittels PCR nachgewiesene Prävalenzraten von *Anaplasma phagocytophilum* in den in dieser Studie untersuchten Wildwiederkäuerspezies (Auswahl)

Land	Wildart	Anzahl Tiere	Prävalenz [%]	Referenz
Belgien / Niederlande	Reh	38	68,4	(Jahfari et al., 2014)
Dänemark	Reh	237	42,6	(Skarphedinsson et al., 2005)
Deutschland	Reh	31	90,3	(Schauer, 2008)
		31	94,0	(Scharf et al., 2011)
		95	98,9	(Overzier et al., 2013a)
Frankreich	Reh	21	95,2	(Dugat et al., 2016)
Italien	Reh	96	18,4	(Beninati et al., 2006)
	Reh	8	50,0	(Torina et al., 2008)
	Reh	59	54,2	(Di Domenico et al., 2016)
	Dam	29	72,4	(Ebani et al., 2007)
	Dam	72	15,3	(Veronesi et al., 2010)
Österreich	Reh	54	74,0	(Petrovec et al., 2003)
	Reh	121	43,0	(Polin et al., 2004)
	Reh	19	52,6	(Silaghi et al., 2011a)
	Muffel	6	50,0	
Polen	Reh	72	31,94	(Adamska und Skotarczak, 2007)
	Reh	166	9,6	(Michalik et al., 2009)
	Dam	44	20,5	
	Reh	31	38,7	(Hapunik et al., 2011)
	Dam	130	1,5	
	Dam	50	14,0	(Adaszek et al., 2012)
Schweiz	Reh	103	18,4	(Liz et al., 2002)
Slowakei	Reh	30	50,0	(Stefanidesova et al., 2008)
	Muffel	2	50,0	
Slowenien	Reh	56	86,0	(Petrovec et al., 2002)
Spanien	Reh	29	38,0	(Oporto et al., 2003)
	Reh	17	18,0	(de la Fuente et al., 2008)
Tschechische Republik	Reh	40	12,5	(Hulinska et al., 2004)
	Dam	15	13,3	
	Muffel	15	13,3	
	Reh	22	32,0	(Petrovec et al., 2003)
	Reh	10	30,0	(Zeman und Pecha, 2008)
	Dam	2	50,0	
	Muffel	28	4,0	
UK	Reh	82	29(Milz) /	(Alberdi et al., 2000)
		84	38(Blut)	
	Reh	279	47,3	(Bown et al., 2009)
	Reh	5	20,0	(Robinson et al., 2009)
	Dam	58	21,0	

1.1.6. Genetische Variabilität

Die Sequenzierung verschiedener (partieller) Gene gab Hinweise auf eine Heterogenität von *A. phagocytophilum*. Am meisten wurden *msp4*, *p44/msp2*, *ankA*, *groEL* und *16S rRNA* bei der Untersuchung von *A. phagocytophilum* genutzt.

Die *16S rRNA* kommt in jeder prokaryotischen Zelle mindestens einmal vor und stellt einen grundlegenden Teil des Genoms dar. Auf der Ebene der Nukleotide enthält sie acht streng konservative Teilstücke, die in nahezu allen Bakterien gleich sind und dazwischen neun variable Teilstücke, die sich durch PCR-Untersuchungen zur Identifikation der Bakterienspezies eignen. Somit stellt dieses Gen auch eine gute Möglichkeit für phylogenetische und taxonomische Studien dar (Jonasson et al., 2007; Wang und Qian, 2009; Woese, 1987).

In Nordamerika sind mehrere Varianten der *16S rRNA* von *A. phagocytophilum* nachgewiesen worden, wobei hauptsächlich zwei Varianten, namentlich Ap-V1 und Ap-ha, vorherrschen. Diese sind in mehreren Studien untersucht worden, dabei fiel auf, dass der Weißwedelhirsch einen Wirt für Ap-V1 darstellt, nicht jedoch für Ap-ha; bei der Weißfußmaus (*Peromyscus leucopus*) verhält es sich umgekehrt. Bei Infektionen von Mensch, Hund und Pferd wurde nur Ap-ha nachgewiesen. Beide Varianten kommen in gleichen geographischen Verbreitungsgebieten und im gleichen Vektor vor. Über die anderen Varianten in den USA liegen zur Zeit noch wenig Informationen vor (Chen et al., 1994; Courtney et al., 2003; Dugat et al., 2015; Massung et al., 2005; Massung et al., 2002; Massung et al., 2003; Michalski et al., 2006).

In Europa gaben die ersten Studien Hinweise darauf, dass Rehwild und Rotwild unterschiedliche Varianten beherbergen könnten, was aber in späteren Studien widerlegt wurde. Die bisher bekannten Daten lassen zur Zeit keine eindeutige Zuordnung bzw. Assoziation von Varianten und Wirten zu, obwohl manche Varianten häufiger in Haus- und Wildwiederkäuern gefunden wurden, andere dagegen in Menschen, Hunden und Pferden (Petrovec et al., 2002; Scharf et al., 2011; Silaghi et al., 2011a; Silaghi et al., 2011d; Zeman und Pecha, 2008).

Die *16S rRNA*-Varianten „B“ und „W“ gelten als Auslöser der HGA bzw. des TBF der Wiederkäuer. Beide wurden jedoch auch schon in anderen asymptomatischen Tierarten nachgewiesen (Nieder et al., 2012; Overzier et al., 2013a)

1.2. *Babesia* spp.

1.2.1. Taxonomie

Bei Babesien handelt es sich um einzellige Protozoen, die obligat in den Erythrozyten ihrer Wirte parasitieren und taxonomisch wie in Abb. 2 dargestellt eingeordnet werden. Es wurden über 100 Spezies mit einem sehr breiten Wirtsspektrum unter den Wirbeltieren beschrieben (Homer et al., 2000).

Stamm: Apicomplexa (Synonym: Sporozoa)
Klasse: Aconoidasida
Ordnung: Piroplasmida
Familie: Babesiidae
Gattung: <i>Babesia</i>

Abbildung 2: Taxonomische Einordnung der Babesien nach (Gray et al., 2010; Homer et al., 2000)

Sie zeichnen sich durch im Blutausstrich sichtbare Formen mit Apikalkomplex, die sich meist tropfen- oder birnenförmig in den befallenen Wirtserythrozyten darstellen, aus. Weiter unterscheidet man anhand ihrer erkennbaren Größe kleine (Trophozoiten $<2,5\mu\text{m}$) und große Babesien (Trophozoiten $>2,5\mu\text{m}$). Dabei scheinen die kleinen Babesien phylogenetisch enger verwandt mit der Gattung *Theileria*, weisen jedoch entwicklungspezifische Unterschiede auf (Allsopp und Allsopp, 2006; Deplazes et al., 2012; Homer et al., 2000; Hunfeld et al., 2008).

Beispiele für kleine Babesien sind *Babesia gibsoni* und *Babesia microti*, Stellvertreter der großen Babesien sind unter anderem *Babesia bovis*, *Babesia caballi* und *Babesia canis* (Homer et al., 2000).

Eine Sonderform stellt die Art *Babesia divergens* dar, die aufgrund ihrer Größe von $0,4\text{-}1,5\mu\text{m}$ zu den kleinen Babesien gehören würde, phylogenetisch aber zu

den großen Babesien gerechnet wird. Sie ist sehr eng mit *Babesia capreoli* verwandt, die sich morphologisch nicht unterscheiden, aber in ihrer Wirtsspezifität. Molekularbiologisch ist eine Unterscheidung aufgrund drei unterschiedlicher Basenpaare in einer *18S rRNA*-Teilnukleotidsequenz möglich (Homer et al., 2000; Malandrin et al., 2010).

1.2.2. Entwicklungszyklus, Vektor

Man unterscheidet in der Entwicklung der Babesien mehrere Stadien, die von zwei unterschiedlichen Wirten abhängen. In Schildzecken, die als Vektor und Endwirt fungieren, finden die Gamogonie (geschlechtliche Vermehrung) und die Sporogonie (ungeschlechtliche Vermehrung) statt. Nach der Aufnahme einer Blutmahlzeit, bei der Merozoiten übertragen wurden, bilden sich in der Zecke männliche und weibliche Gamonten, die sich zur Zygoten vereinen. Diese bildet dann Kineten und Sporokineten, die in Speicheldrüse und Ovarien der Zecke wandern. Es findet sowohl eine transovarielle Übertragung auf die nächste Zeckengeneration als auch eine transstadiale Übertragung auf die nächste Entwicklungsstufe statt. Bei der nächsten Blutmahlzeit werden die Sporozoiten auf einem Wirbeltier-Wirt übertragen, indem sie sich ungeschlechtlich vermehren und zu Trophozoiten und Merozoiten (Merogonie) weiterentwickeln (Deplazes et al., 2012; Homer et al., 2000; Suss et al., 2004; Uilenberg, 2006).

Sechs von sieben Genera der Ixodidae wurden experimentell oder in Feldversuchen als mögliche Überträger nachgewiesen, unter anderem *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor* und *Hyalomma*. Beispiele für Zeckenarten, die *Babesia* spp. beherbergen können sind *I. ricinus*, *I. scapularis*, *I. trianguliceps* und *Dermacentor reticulatus*. Einige *Babesia* spp. sind in der Lage mehrere verschiedene Zeckengattungen zu befallen und einige Zeckenarten können als Vektor für mehrere *Babesia* spp. fungieren (Homer et al., 2000; Hunfeld et al., 2008; Uilenberg, 2006).

In Mitteleuropa stellt *I. ricinus* den häufigsten Vektor für auf Wildwiederkäuer übertragbare Babesien dar und wird auch für die Übertragung von *B. divergens* und *B. venatorum* auf den Menschen verantwortlich gemacht (Homer et al., 2000; Vannier und Krause, 2009; Zintl et al., 2003). Ein Vergleich von Prävalenzen in Zecken gestaltet sich durch die große Zahl unterschiedlicher Spezies schwierig.

Beispielhafte Prävalenzen einiger Babesienarten in *I. ricinus* in Deutschland sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Mittels PCR nachgewiesene Prävalenzraten von *Babesia* spp. in wirtssuchenden *Ixodes ricinus* in Deutschland (Auswahl)

Nachgewiesene Babesienarten	Gesamtprävalenz [%]	Referenz
<i>B. microti</i>	3,5	(Eshoo et al., 2014)
<i>B. divergens</i> <i>B. microti</i>	10,7	(Franke et al., 2010)
<i>B. divergens</i> <i>B. microti</i>	8,9	(Franke et al., 2011)
<i>B. divergens</i> <i>B. microti</i>	1,0	(Hartelt et al., 2004)
<i>B. divergens</i> <i>B. microti</i>	5,0	(Hildebrandt et al., 2010)
<i>Babesia</i> spp.	10,7	(Hildebrandt et al., 2011)
<i>B. capreoli</i> <i>B. microti</i> <i>B. venatorum</i>	1,0	(Overzier et al., 2013b)
<i>B. capreoli</i> <i>B. microti</i> <i>B. venatorum</i>	2,5-3,3	(Overzier et al., 2013a)
<i>B. divergens</i> <i>B. gibsoni-like</i> <i>B. venatorum</i>	0,4-0,7	(Schorn et al., 2011)
<i>B. capreoli</i> <i>B. divergens</i> <i>B. microti</i> <i>B. venatorum</i>	4,1	(Silaghi et al., 2012b)

1.2.3. Historisches

1888 entdeckte Victor Babes, Arzt und Leiter des Instituts für pathologische Anatomie und Bakteriologie in Bukarest, Rumänien, Mikroorganismen in den Erythrozyten von Rindern, die an boviner Hämoglobinurie bzw. an dem sog. Red-Water-Fever erkrankt waren. In den USA entdeckte er die gleichen Mikroorganismen im Blut von Schafen. Smith und Kilborne gaben diesem Erreger fünf Jahre später den Namen *Pyrosoma bigemium* und wiesen dessen Übertragung durch Zecken nach. Im gleichen Jahr noch benannte Starcovici die Parasiten als *B. bovis*, *B. ovis* und *B. bigemina*. Da der Name *Pyrosoma* schon anderweitig verwendet wurde, setzte sich *Babesia* als Genusbezeichnung durch (dargestellt in der Übersichtsarbeit von (Uilenberg, 2006)). *Babesia divergens* findet seinen Eingang in die Literatur 1911 durch M'Fadyean und Stockman (zitiert in (Zintl et al., 2003)).

Eine klinische Erkrankung des Menschen mit *B. bovis* wurde erstmals 1957 im damaligen Jugoslawien diagnostiziert. Seitdem werden immer wieder Fälle von *B. divergens* und *B. venatorum* in immunsupprimierten Patienten in den gemäßigten Klimazonen in Europa und Fälle von Infektionen mit *B. microti* und *Babesia duncani* in den USA bekannt (Homer et al., 2000; Vannier und Krause, 2009).

1962 wurde in Deutschland erstmals eine neue Spezies im Rehwild beschrieben und als *B. capreoli* benannt (Enigk und Friedhoff, 1962a).

Babesia venatorum (Synonym: *Babesia* sp. EU1), dem eine sehr enge Verwandtschaft zu *B. divergens* nachgewiesen wurde, wurde erstmals 2003 im Menschen nachgewiesen und zwei Jahre später von im Blut von Rehwild (Duh et al., 2005; Herwaldt et al., 2003).

1.2.4. Klinik

Babesia spp. sind als Auslöser der Babesiose bekannt. Diese weltweit vorkommende Krankheit betrifft nicht nur Tiere, sondern auch zunehmend den Menschen und wird darum als „Emerging Zoonosis“ bezeichnet (Akel und Mobarakai, 2017; Homer et al., 2000).

In Europa wird überwiegend *B. divergens* als Erreger der Babesiose des Menschen identifiziert und die Verläufe sind schwerwiegender als in den USA, aber die Anzahl der Erkrankungen geringer. Erkrankungen mit *B. divergens*

betreffen fast ausschließlich splenektomierte oder anderweitig immunsupprimierte Menschen, während *B. microti* auch im immunkompetenten Menschen Erkrankungen auslöst (Akel und Mobarakai, 2017; Homer et al., 2000). In den USA scheint die humane Babesiose weiter verbreitet. In den Jahren 2011-2013 wurden 3797 Neuerkrankungen an die Centers for Disease Control and Prevention (CDC) gemeldet. Auslöser ist hier jedoch überwiegend *B. microti*. In Europa sind bis heute nur ca. fünfzig Fälle in der Literatur dokumentiert und die Verläufe werden als milder beschrieben (Haselbarth et al., 2007; Herwaldt et al., 2003; Hildebrandt et al., 2007; Homer et al., 2000; Rozej-Bielicka et al., 2015). Nur vereinzelt wurde in Europa auch andere *Babesia* spp. (*B. microti*, *B. venatorum*, *B. odocoilei* nachgewiesen (Haselbarth et al., 2007; Herwaldt et al., 2003; Welfaleciak et al., 2015).

Der Verlauf beim Menschen, abhängig von der Immunsituation des Betroffenen und der Babesienart, variiert von klinisch inapparent bis zu einem plötzlich einsetzenden, schweren Krankheitsbild, das der Malaria ähnelt und bis zum Tod führen kann. Fünf Tage bis neun Wochen nach der Infektion können sich als unspezifische Symptome allgemeines Unwohlsein, Frösteln, Muskelschmerzen, Erschöpfung und Fieber zeigen, zum Teil sind auch Übelkeit, Erbrechen, nächtliches Schwitzen und Gewichtsverlust beschrieben sowie eine Vergrößerung von Leber und Milz. Die Hämolyse durch die Vermehrung des Erregers und der damit verbundenen Zerstörung der Erythrozyten führt zu Anämie, Ikterus und Hämoglobinurie (Gray et al., 2010; Homer et al., 2000; Suss et al., 2004).

Bei Tieren ist eine Vielzahl von Arten bekannt, die an Babesiose erkranken können, wie zum Beispiel Pferde, Hunde, Schweine, etc. Daher wird hier nur auf *B. divergens* als Auslöser des „Weiderots“ beim Rind eingegangen. Hier zeichnet sich die Krankheit durch Fieber, Fraßunlust, Abgeschlagenheit, Schwäche, mangelndes Wiederkäuen und einem Anstieg der Atmungs- und Herzfrequenz aus. Die mukösen Schleimhäute erscheinen blass und oft wird Durchfall beobachtet. Das auffälligste klinische Zeichen ist jedoch die Hämoglobinurie (Uilenberg, 2006; Zintl et al., 2003).

1.2.5. *Babesia* spp. in Wildwiederkäuern

In Europa spielen vor allem drei Babesienarten bei Wildwiederkäuern eine Rolle: *B. venatorum*, *B. divergens* und *B. capreoli* (Malandrin et al., 2010). Die Prävalenzen im Rehwild in Europa, welches die am meisten untersuchte Wildwiederkäuerart darstellt, schwanken hier stark (Tab. 4).

Tabelle 4: Mittels PCR nachgewiesene Prävalenzraten von *Babesia* spp. in Rehwild

Land	Nachgewiesene Spezies	Anzahl Tiere	Gesamtprävalenz [%]	Referenz
Deutschland	<i>B. capreoli</i> , <i>B. microti</i> <i>B. venatorum</i>	95	89,5	(Overzier et al., 2013a)
Italien	<i>B. divergens</i> <i>B. microti-like</i> <i>B. MO1</i> <i>B. venatorum</i>	113	31	(Tampieri et al., 2008)
	<i>B. bigemina</i> <i>B. capreoli</i> <i>B. venatorum</i>	462	12,55	(Zanet et al., 2014)
Polen	<i>B. divergens</i>	67	24,4	(Sawczuk et al., 2005)
	<i>B. capreoli</i> <i>B. divergens</i> <i>B. venatorum</i>	67	26,1	(Welc-Faleciak et al., 2013)
Schweden	<i>B. capreoli</i> <i>B. venatorum</i>	77	52	(Andersson et al., 2016)
Schweiz	<i>B. capreoli</i>	46	26,1	(Hoby et al., 2009)
	<i>B. capreoli</i> <i>B. venatorum</i>	222	23,9	(Michel et al., 2014)
Slovenien	<i>B. divergens</i> <i>B. venatorum</i>	76,5	21,6	(Duh et al., 2005)

Damwild und Muffelwild sind bei wenigen Studien bisher mituntersucht worden, allerdings konnten Babesien nur einmal in Österreich bei Damwild nachgewiesen werden. Hier zeigte eines von sieben Tieren ein positives Ergebnis für *B. capreoli*. In Spanien konnte bei einer Untersuchung von 50 Mufflons bei sechs Tieren serologisch eine Infektion mit *B. ovis* nachgewiesen werden. Hierzu wurde ein indirekter Fluoreszenz-Antikörpertest-Test auf Basis eines *B. ovis*-Isolates ovinen Ursprungs verwendet (Ferrer et al., 1998a; Pereira et al., 2016; Rehbein et al., 2014; Tampieri et al., 2008; Zanet et al., 2014).

Klinisch wurde bei experimentellen Infektionsstudien mit Muffel-, Rot-, Reh- und Damwild ein sehr milder Verlauf für *B. divergens* beobachtet, wobei das Blut all dieser Tiere infektiös für Rinder war (Enigk und Friedhoff, 1962b). Eine Ausnahme bildet hier das Rentier, das in einer anderen Studie schwere klinische Symptomen zeigte (Nilsson et al., 1965). Im Gegensatz dazu scheint *B. capreoli* meist eine subklinische Infektion in den Wildtieren auszulösen, scheint aber weder infektiös für Rinder noch für den Menschen (Malandrin et al., 2010).

Auch gibt es in der Literatur immer wieder Fallberichte von Tieren, wie Gämsen und Rentieren, die ebenfalls äußerlich eine Erkrankung zeigen oder gar verendet sind. Hier wurden *B. divergens* und *B. capreoli* nachgewiesen (Hoby et al., 2009; Hoby et al., 2007; Langton et al., 2003; Schmid et al., 2008).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Proben

Es wurden Milzproben von Wildwiederkäuern an 13 verschiedenen Standorten, die sich auf 7 verschiedene Bundesländer in Deutschland erstreckten, gesammelt. An 11 Standorten kamen sowohl Reh- als auch Muffelwild sympatrisch vor, an einem Standort wurde ausschließlich Damwild in einem Gehege gehalten und an einem Standort kam nur Muffelwild vor (Tab. 5).

Tabelle 5: Herkunftsdaten der Wildtierproben

Nr.	Bundesland	Bezeichnung	Koordinaten	Tierbestand
1	Brandenburg	Schlaubetal	52° 07' N, 14° 30' O	Muffel-, Rehwild
2	Sachsen	Königshainer Berge	51° 11' N, 14° 50' O	Muffel-, Rehwild
3	Sachsen	Osterzgebirge	50° 52' N, 13° 38' O	Muffel-, Rehwild
4	Sachsen	Vogtland	50° 25' N, 11° 59' O	Muffel-, Rehwild
5	Thüringen	Reinstädter Grund	50° 48' N, 11° 28' O	Muffel-, Rehwild
6	Thüringen	Stadtroda	50° 51' N, 11° 44' O	Muffel-, Rehwild
7	Sachsen-Anhalt	Ostharz	51° 41' N, 11° 02' O	Muffel-, Rehwild
8	Thüringen	Eichsfeld	51° 15' N, 10° 12' O	Muffel-, Rehwild
9	Nordrhein-Westfalen	Wittgensteiner Land	50° 59' N, 08° 02' O	Muffel-, Rehwild
10	Rheinland-Pfalz	Donnersberg	49° 37' N, 07° 54' O	Muffel-, Rehwild
11	Nordrhein-Westfalen	Eifel	50° 34' N, 06° 25' O	Muffel-, Rehwild
12	Nordrhein-Westfalen	Brüggen- Bracht	51° 15' N, 06° 11' O	Damwild
13	Bayern/Hessen	Rhön	50° 22' N, 09° 55' O	Muffelwild

Insgesamt wurden 364 Wildtierproben, die sich auf 153 Rehwild-, 168 Muffelwild- und 43 Damwildproben aufteilen, zwischen Mai 2009 und November 2010 gesammelt.

Die Tiere wurden im Rahmen der regulären Jagdstrecke erlegt und aufgebroschen. Dabei wurde jeweils eine ca. 1cm³ große Gewebeprobe der Milz entnommen. Die Probe wurde mit einer sterilen Stanze ausgelöst und in 15ml Probengefäßen, die mit 70%igen Ethanol gefüllt waren, konserviert. Um Kontaminationen zu vermeiden wurde für jede Probe einzeln das gesamte Material zusammengestellt, nummeriert und den Jagdausübungsberechtigten zur Verfügung gestellt. Bei jeder Probennahme wurde der Gesundheitszustand und das Geschlecht des Tieres von dem jeweiligen Jagdausübungsberechtigten bestimmt und es erfolgte eine Einteilung in drei Altersstufen (<1 Jahr; 1-2 Jahre; >2 Jahre). Abgesehen von vier Tieren (ein Reh, zwei Mufflons, ein Damhirsch) wurden alle Tiere als gesund eingestuft.

Die Damwildproben teilen sich in 12 männliche und 28 weibliche Tiere auf; für drei Tiere lag keine Geschlechtsbestimmung vor. Jünger als ein Jahr wurden 19 Tiere eingeschätzt, zwischen ein und zwei Jahren drei Tiere und über zwei Jahre 17 Tiere; für vier Tiere lag keine Altersbestimmung vor. Geschlecht und Alter der beiden anderen Wildtierarten sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Anzahl, Geschlecht und Alter der untersuchten Reh- und Muffelwildproben an den einzelnen Standorten

Standort	Rehwild								Muffelwild								Alle Tiere
	Geschlecht ¹				Alter (Jahre) ²				Geschlecht ¹				Alter (Jahre) ²				
	Alle	M	W	?	<1	1-2	>2	?	Alle	M	W	?	<1	1-2	>2	?	
1	23	8	15	-	6	1	16	-	2	2	-	-	2	-	-	-	25
2	3	2	1	-	-	1	2	-	12	6	6	-	3	5	4	-	15
3	13	7	5	1	4	6	2	1	12	6	3	3	7	3	1	1	25
4	9	2	7	-	5	-	3	1	16	7	9	-	4	4	6	2	25
5	7	5	2	-	-	3	4	-	20	13	7	-	3	6	11	-	27
6	13	6	7	-	2	6	5	-	10	7	3	-	1	3	6	-	23
7	31	10	20	1	12	9	10	-	17	8	9	-	5	-	12	-	48
8	17	8	9	-	6	3	8	-	18	12	6	-	8	3	7	-	35
9	5	1	4	-	1	-	4	-	1	1	-	-	-	1	1	-	6
10	4	1	-	3	1	-	-	3	7	2	-	5	1	1	-	5	11
11	28	17	11	-	9	5	14	-	38	27	11	-	10	8	20	-	66
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	15	4	11	-	6	4	5	-	15
Gesamt	153	67	81	5	46	34	68	5	168	95	65	8	50	37	73	8	321

¹ M=männlich; W=weiblich; ?=unbekannt

² <1=unter einem Jahr; 1-2=1-2 Jahre; >2= über zwei Jahre; ?=unbekannt

2. DNA Extraktion

Aus jeder Probe wurde im Labor ein ca. 3mm³ großes Stück mit je einem sterilen Einwegskalpell herausgeschnitten und aus diesem mit dem QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) die DNA gemäß der Gebrauchsanweisung für Gewebeproben isoliert, wobei alle Proben über Nacht bei 56°C inkubiert wurden und statt eines einzelnen Elutionsschrittes mit 200µl Pufferlösung, zweimal mit je 100µl Pufferlösung eluiert wurde. Diese Modifikation sollte die quantitative DNA-Ausbeute erhöhen.

Anschließend wurde Qualität und Quantität der DNA-Isolierung bei jeder Probe durch eine spektrophotometrische Messung mittels NanoDrop®ND-1000 (PeqLab, Erlangen, Deutschland) überprüft.

Proben mit sehr hoher DNA-Ausbeute (>100ng/µl) wurden im Verhältnis 1:2 mit Pufferlösung verdünnt, um falsch negative Ergebnisse aufgrund zu hoher DNA-Konzentrationen zu vermeiden.

3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

3.1. *Anaplasma phagocytophilum*

3.1.1. Real-time-PCR

Alle Proben wurden auf das Vorkommen von DNA von *A. phagocytophilum* mit einer Real-Time-PCR untersucht (Courtney et al., 2004). Hierfür wurde ein 77bp großes Teilstück des *msp2*-Gens amplifiziert. Es wurde das AB-7500-FAST Real-Time PCR-System und der TAQMAN® Gene Expression Master Mix von Applied Biosystems® (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Als positiv wurde eine Probe angesehen, deren ct-Wert unter 39,0 lag. Verwendete Primer, Reagenzien und physikalische Bedingungen der PCR sind in Tabelle 7 dargestellt, als Positivkontrolle wurde ein in vitro kultiviertes *A. phagocytophilum*-Isolat aus IDE-8 Zeckenzellen eingesetzt.

Tabelle 7: Verwendete PCR-Primer und physikalische Bedingungen der PCR-Untersuchung (*A. phagocytophilum/msp2*)

Erreger	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	
Gen	<i>msp2</i>	
Primersequenz / Sondensequenz	ApMsp2f	5'-ATGGAAGGTAGTGTGGTTATGGTATT-3'
	ApMsp2r	5'-TTGGTCTTGAAGCGCTCGTA-3'
	ApMsp2p	5'TGGTGCCAGGGTTGAGCTTGAGATTG-3' Am 5'Ende FAM (Carboxy-Fluoreszin) und am 3'Ende TAMRA (Carboxyl-Tetramethyl- Rhodamine) markiert
Reaktionsansatz	Gene Expression TaqMan MMX	19,375 µl
	Primer ApMsp2f (10 µM)	0,250 µl
	Primer ApMsp2r (10 µM)	0,250 µl
	Sonde ApMsp2p (10 µM)	0,125 µl
	Proben-DNA	5,000 µl
Temperaturprotokoll	Initiale Denaturierung	2min 50°C
		10min 95°C
	Denaturierung	15sek 95°C
	Annealing/Elongation	1min 60°C
	Finale Elongation	15sek 60°C
	40 Wiederholungen ¹	
Referenz	(Courtney et al. 2004)	

¹ Wiederholungen beziehen sich auf die Schritte Denaturierung und Annealing/Elongation

3.1.2. Nested PCR

Zwei bis acht positiv getestete Proben von jedem Standort, abhängig von der Anzahl der jeweils verfügbaren Proben, wurden ausgewählt und mittels einer weiteren PCR untersucht, die ein 497bp großes Teilstück des *16S rRNA*-Gens in einer nested PCR amplifiziert (Massung et al., 2002). Die Reaktionen fanden im Thermocycler Mastercycler®gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) statt und es wurde das HotStarTaq DNA Polymerase Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Verwendete Primer, Reagenzien und physikalische Bedingungen der PCR sind in Tabelle 8 dargestellt, als Positivkontrolle wurde ein in vitro kultiviertes *A. phagocytophilum*-Isolat aus IDE-8 Zeckenzellen eingesetzt.

Tabelle 8: Verwendete PCR-Primer und physikalische Bedingungen der PCR-Untersuchung (*A. phagocytophilum*/16S rRNA)

Erreger	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>						
Gen	16S rRNA						
Amplifikation	1			2			
Primersequenz / Sondensequenz	Ge3a	5' CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC'3			Ge9f	5' AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT'3	
	Ge10r	5' TTCGGTTAAGAAGGATCTAATCTCC'3			Ge2	5' GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG'3	
Reaktionsansatz	MgCl ₂ (25 mM)	1,0 µl		MgCl ₂ (25 mM)	1,0 µl		
	H ₂ O	36,5 µl		H ₂ O	40,5 µl		
	Primer ge3a (100 µM)	0,5 µl		Primer ge9f (100 µM)	0,5 µl		
	Primer ge10r (100 µM)	0,5 µl		Primer ge2 (100 µM)	0,5 µl		
	Puffer 10x	5,0 µl		Puffer 10x	5,0 µl		
	dNTPs (10 mM)	1,0 µl		dNTPs (10 mM)	1,0 µl		
	HotStar Taq Plus (5 U/µl)	0,5 µl		HotStar Taq Plus (5 U/µl)	0,5 µl		
	Proben-DNA	5,0 µl		Amplifikat aus 1. Schritt	1,0 µl		
Temperatur- protokoll	Initiale Denaturierung	15min	95°C	Initiale Denaturierung	15min	95°C	
	Denaturierung	30sek	94°C	Denaturierung	30sek	94°C	
	Annealing	30sek	55°C	Annealing	30sek	55°C	
	Elongation	1min	72°C	Elongation	1min	72°C	
	Finale Elongation	5min	72°C	Finale Elongation	5min	72°C	
		40 Wiederholungen ¹			25 Wiederholungen ¹		
Referenz	(Massung et al. 1998)			(Massung et al. 1998)			

¹Wiederholungen beziehen sich auf die Schritte Denaturierung und Annealing/Elongation

3.2. *Babesia* spp.

Alle Proben wurden auf das Vorkommen von DNA von *Babesia* spp. mit einer konventionellen PCR untersucht, die ein 411-452bp großes Teilstück des 18S rRNA-Gens amplifiziert (Casati et al., 2006). Die Reaktionen fanden in dem Thermocycler Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) statt und es wurde das HotStarTaq DNA Polymerase Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Verwendete Primer, Reagenzien und physikalische Bedingungen der PCR sind in Tabelle 9 dargestellt, als Positivkontrolle wurde DNA aus Blut von Rindern mit natürlicher *B. divergens*-Infektion eingesetzt.

3.3. *Theileria* spp.

Bei der Auswertung der *Babesia* spp.-Sequenzen zeigten vier Proben eine Übereinstimmung mit *Theileria* spp. Um diese genauer zu charakterisieren wurden sie in einer weiteren konventionellen PCR untersucht, die ein 650bp großes Teilstück des 18S rRNA-Gens amplifiziert (Sawczuk et al., 2008). Die

Reaktionen fanden in dem Thermocycler Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) statt und es wurde das HotStarTaq DNA Polymerase Kit verwendet (Qiagen, Hilden, Deutschland). Verwendete Primer, Reagenzien und physikalische Bedingungen der PCR sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Verwendete PCR-Primer und physikalische Bedingungen der PCR-Untersuchung (*Babesia* spp. / *Theileria* spp.)

Erreger	<i>Babesia</i> spp		<i>Theileria</i> spp.			
Gen	18S rRNA		18S rRNA			
Primersequenz / Sondensequenz	BJ1	5'GTCTTGTAATTGGAATGATGG'3	TH for	5'TGACACAGGGAGGTAGTGA'3		
	BN2	5'TAGTTTATGGTTAGGACTACG'3	TH rev	5'TCAGCCTTGCACCATACT'3		
Reaktionsansatz	Puffer 10x	5,00 µl	Puffer 10x	5,00 µl		
	dNTPs (10 mM)	1,00 µl	dNTPs (10 mM)	1,00 µl		
	Primer BJ1 (100 µM)	0,50 µl	Primer TH FOR (100 µM)	0,50 µl		
	Primer BN2 (100 µM)	0,50 µl	Primer TH REV (100 µM)	0,50 µl		
	H ₂ O	37,75 µl	H ₂ O	37,75 µl		
	HotStar Taq Plus (5 U/µl)	0,25 µl	HotStar Taq Plus (5 U/µl)	0,25 µl		
	Proben-DNA	5,00 µl	Proben-DNA	5,00 µl		
Temperatur- protokoll	Initiale Denaturierung	5min	95°C	Initiale Denaturierung	3min	94°C
	Denaturierung	30sek	94°C	Denaturierung	45sek	94°C
	Annealing	30sek	55°C	Annealing	45sek	65°C
	Elongation	40sek	72°C	Elongation	45sek	72°C
	Finale Elongation	5min	72°C			
		40 Wiederholungen ¹		40 Wiederholungen ¹		
Referenz	(Casati et al. 2006)		(Sawczuk et al. 2008)			

¹ Wiederholungen beziehen sich auf die Schritte Denaturierung und Annealing/Elongation

4. Agarose-Gelelektrophorese

Alle konventionellen PCR-Produkte wurden durch eine Gel-Elektrophorese ausgewertet. Hierzu wurden die Proben auf 2%iges Agarosegel (TopVision Agarose, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), das mit GEL RED™ (Nucleid Acid Stain 10000x in Wasser) (Biotium, Hayward, USA) bis zu einer Endkonzentration von 0,1% versetzt wurde, aufgetragen. Zur Bewertung der PCR-Produkte wurde bei jeder Auswertung eine Positivkontrolle, sowie eine Negativkontrolle mit eingesetzt, wobei, um vergleichbare Banden zu erhalten, ein standardisierter DNA-Längenmaßstab (GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet wurde. Die Auswertung wurde nach Visualisierung unter UV-Licht (PeqLab, Erlangen, Deutschland) vorgenommen.

PCR-Ergebnisse wurden als positiv bewertet, wenn sich die Bande eines PCR-Produkts auf gleicher Höhe wie die Positivkontrolle darstellte.

5. Sequenzanalyse

PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers aufgereinigt und zur Sequenzanalyse an ein externes Labor (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) geschickt.

Die Produkte aus den Babesien- und Theilerienuntersuchungen wurden jeweils mit einem Primer sequenziert. Im Falle von Überlagerungen in der Darstellung verschiedener Basen in den Sequenzen wurde diese auch mit dem zweiten Primer analysiert. Nach der konventionellen Nested-PCR mit dem Zielgen *16S rRNA* von *A. phagocytophilum* wurde eine Sequenzanalyse in beide Richtungen mit beiden Primern aus der zweiten Amplifikation durchgeführt. Damit sollte sichergestellt werden, dass das komplette Teilstück mit seinen 497bp darstellbar wird. Die Sequenzen wurden mit CHROMASLITE® (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australien) dargestellt und ausgewertet.

Gegenläufige Sequenzierungsergebnisse wurden mit dem Programm reverse complement (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) in die gleiche Reihenfolge gebracht und mit dem Programm ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) übereinandergelegt.

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit dem BLASTn tool des National Center for Biotechnology (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit den vorliegenden Daten der GenBank verglichen.

6. Statistik

Die Daten wurden in MSExcel Tabellen (Microsoft Cooperation, Redmont, Seattle, USA) zur Berechnung der Prävalenz eingegeben und mit dem Programm Prism 5 (GraphPad Prism®; La Jola, Kalifornien, USA) weitergehend analysiert. Um mögliche Abhängigkeiten zwischen Infektion und Wirtsspezies, Wirtsalter oder -geschlecht zu untersuchen wurden der χ^2 -Test und der exakte Test nach Fisher durchgeführt. Ebenso wurde dies zu Untersuchung einer Beziehung zwischen den beiden Erregern angewendet. Es wurde ein Signifikanzniveau von

$p=0,05$ angenommen.

Proben, die ein positives Ergebnis für *Theileria* spp. zeigten, blieben in der statistischen Auswertung unberücksichtigt.

IV. ERGEBNISSE

1. Publikation

Die Ergebnisse dieser Studie wurden in einer englischsprachigen Publikation veröffentlicht.

Anaplasma phagocytophilum and *Babesia* spp. in roe deer (*Capreolus capreolus*), fallow deer (*Dama dama*) and mouflon (*Ovis musimon*) in Germany

Melanie Kauffmann^a, Steffen Rehbein^b, Dietmar Hamel^b, Walburga Lutz^c, Mike Heddergott^d, Kurt Pfister^a, Cornelia Silaghi^{a, e*}

^aComparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

^bMerial GmbH, Kathrinenhof Research Center, Rohrdorf, Germany

^cForschungsstelle für Jagdkunde und Wildschadenverhütung, Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW, Bonn, Germany

^dMusée Nationale d' Histoire Naturelle, Luxembourg, Luxembourg

^ePresent address: National Center for Vector Entomology, Vetsuisse Faculty, University of Zürich, Switzerland

Journal: **Molecular and Cellular Probes** (SI: Vectors and Vector-Borne Diseases)

Volume 31, February 2017, Pages 46-54

Impact factor: 1.565

Eingereicht: 15. April 2016

Akzeptiert: 17. August 2016

Anaplasma phagocytophilum and *Babesia* spp. in roe deer (*Capreolus capreolus*), fallow deer (*Dama dama*) and mouflon (*Ovis musimon*) in Germany

Melanie Kauffmann^a, Steffen Rehbein^b, Dietmar Hamel^b, Walburga Lutz^c, Mike Heddergott^d, Kurt Pfister^a, Cornelia Silaghi^{a, e*}

^a*Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany*

^b*Merial GmbH, Kathrinenhof Research Center, Rohrdorf, Germany*

^c*Forschungsstelle für Jagdkunde und Wildschadenverhütung, Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW, Bonn, Germany*

^d*Musée Nationale d' Histoire Naturelle, Luxembourg, Luxembourg*

^e*Present address: National Center for Vector Entomology, Vetsuisse Faculty, University of Zürich, Switzerland*

Corresponding author:

PD Dr. Cornelia Silaghi

National Center for Vector Entomology

Institute of Parasitology, University of Zurich

Winterthurerstr. 266A

8057 Zurich, Switzerland

Phone ++41 44 635 85 27

cornelia.silaghi@uzh.ch

ABSTRACT

Infections with the tick-borne pathogens *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. can cause febrile disease in several mammalian species, including humans. Wild ruminants in Europe are suggested to serve as reservoir hosts for particular strains or species of these pathogens. The aims of this study were to investigate the occurrence of *A. phagocytophilum* and *Babesia* spp. in roe deer (*Capreolus capreolus*), fallow deer (*Dama dama*) and mouflon (*Ovis musimon orientalis*) in Germany, and the diversity and host association of genetic variants of *A. phagocytophilum* and *Babesia* species. From 2009 to 2010, 364 spleen samples from 153 roe deer, 43 fallow deer and 168 mouflon from 13 locations in Germany were tested for DNA of *A. phagocytophilum* and *Babesia* spp. by real-time PCR or conventional PCR, respectively. Variants of *A. phagocytophilum* were investigated with a nested PCR targeting the partial *16S rRNA* gene, and species of piroplasms were identified by sequencing. DNA of *A. phagocytophilum* was detected in 303 (83.2%) samples: roe deer, 96.1% (147/153); fallow deer, 72.1% (31/43); and mouflon, 74.4% (125/168). Sequence analysis of *16S rRNA*-PCR products revealed the presence of nine different genetic variants. DNA of *Babesia* spp. was found in 113 (31.0%) samples: roe deer, 62.8% (96/153); fallow deer, 16.3% (6/43); and mouflon, 6.5% (11/168). *Babesia capreoli*, *Babesia* sp. EU1 (referred to also as *B. venatorum*), *B. odocoilei*-like and a *Theileria* species were identified. Co-infections with *A. phagocytophilum* and *Babesia* spp. were identified. Co-infections with *A. phagocytophilum* and *Babesia* spp. were detected in 30.0% of the animals which were tested positive for *A. phagocytophilum* and/or *Babesia* spp. Roe deer had a significantly higher percentage of co-infections (60.8%), followed by fallow deer (14.0%) and mouflon (6.5%). Thus, the results suggest that roe deer plays a key role in the endemic cycles of the pathogens investigated.

Keywords:

Anaplasma phagocytophilum, *Babesia* spp., *Theileria*, wild ruminants, Germany

1. Introduction

The distribution of tick-borne pathogens depends on the occurrence of ticks, tick hosts and competent reservoirs. Wild ungulates constitute important hosts for ticks and, thus, play a critical role in the life cycles of ticks as well as in the transmission cycles of several tick-borne pathogens [1]. The main vector for the obligate intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum* and several *Babesia* species in Europe is the most common hard tick *Ixodes ricinus*. These pathogens are of increasing importance in Europe [2].

Whilst *A. phagocytophilum* is one of the most common tick-borne disease agents of humans in USA, it is rarely detected in humans in Europe, despite that it being commonly detected in ticks in this geographic region [3]. Human babesiosis is considered as an emerging zoonosis in Europe [4] and, in the last decade, two clinical cases of human babesiosis caused by *B. microti* and *Babesia* sp. EU1 (referred to also as *B. venatorum*), respectively, have been reported [5,6]. In Europe, evidence of *A. phagocytophilum* infection or previous contact has been established for a large variety of wild mammalian species [7,8] Among these animals are several species of rodents, insectivores and hares (*Lepus europaeus*) [9-13], wild carnivores, such as the red fox (*Vulpes vulpes*), Eurasian lynx (*Lynx lynx*), timber wolf (*Canis lupus lycaon*) and racoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) [14-18], brown bear (*Ursus arctos*) [19], and several wild ungulates, such as wild boar (*Sus scrofa*), roe deer (*Capreolus capreolus*), moose (*Alces alces*), red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), European bison (*Bison bonasus*), feral goat (*Capra aegagrus hircus*), Alpine ibex (*Capra ibex*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*) [23-27]. *Anaplasma phagocytophilum* is a genetically heterogeneous species as has been shown on the basis of different genes, such as *16S rRNA*, *groEL*, *msp4*, *msp2* and *ankA*, and several housekeeping genes [28-30]. It was suggested that variation may be associated with host preference or pathogenicity, or might depend on the geographical distribution [8,24, 29-31].

Currently several *Babesia* species have been detected in wild ungulates in Europe: *B. capreoli*, *B. divergens*, *B. bigemina*, *B. motasi*, *B. ovis* and *Babesia* sp. EU1 [27, 32-38]. In addition, evidence was provided of genetic variants, such as a *B. odocoilei*-like taxon in red deer or *Babesia* sp. MO1 and *Babesia* sp. CH1 in roe

deer, respectively [35,38].

Systematic studies of the occurrence of *A. phagocytophilum* and *Babesia* species in wild ruminant populations covering a large geographic area from Germany are lacking. However, based on previous studies from Alpine regions in Austria and Switzerland as well as from Southern Germany [26,27,37,38], it has been hypothesised that these tick-borne pathogens occur also more widespread in wild ruminant populations in Germany.

The aims of this study were to investigate the presence of *A. phagocytophilum* and *Babesia* spp. in roe deer, fallow deer and mouflon in Germany with particular attention to the occurrence of the pathogens in sympatric populations of roe deer and mouflon. In addition, the occurrence of *A. phagocytophilum* variants based on the variation in the partial *16S rRNA*-gene as well as the diversity of *Babesia* species and potential host-pathogen associations were investigated.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling

Spleen samples from roe deer, fallow deer and mouflon (*Ovis musimon orientalis*) were donated by hunters from 13 locations in seven federal states in Germany (Figure 1) during the hunting seasons from May 2009 to November 2010. Eleven of the locations had sympatric roe deer and mouflon populations, and one each had fallow deer or mouflon only. Spleen samples (1 cm³) were taken from individual animals using a sterile tissue punch (for each sample) and preserved in 70% ethanol in 15 ml Falcon tubes. To prevent contamination, collectors were provided with individually labelled materials and with detailed instruction on the sampling procedure. Spleen samples were collected from a total of 364 wild ungulates (153 roe deer, 168 mouflon and 43 fallow deer). Information on the sex and age of the animals was also collected (Table 1); animals were stratified into three age groups: <1 year, 1-2 years and >2 years.

2.2. DNA extraction

The extraction of genomic DNA from the spleen was carried out with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instruction for animal tissues. Samples were incubated over night at 56 °C and eluted twice with 100 µl of buffer each time. DNA content and quality were assessed using a spectrophotometer (NANODROP® ND-1000, Peqlab, Erlangen, Germany). Samples with high amounts of DNA (exceeding 100 ng/µL) were diluted (1:2) using elution buffer.

2.3. Polymerase chain reaction (PCR)

All samples were screened for the presence of DNA of *A. phagocytophilum* using a real-time PCR, targeting a 77 bp region of the *msp2* gene, as described previously [27]. Two to eight *A. phagocytophilum* test-positive samples from each location (depending on the number of samples available from a particular location) were selected and a PCR targeting of a 497 bp part of the *16 S rRNA* gene was performed as described elsewhere [28,39]. For the detection of *Babesia*-DNA, a PCR targeting a part of the *18S rRNA* gene was performed as described previously [40,41]. The sequence of this part of the gene allows the discrimination between *B. capreoli* and *B. divergens* [42]. To further characterize the *Theileria* spp., which had been amplified in the *Babesia*-PCR, a conventional PCR targeting a 650 bp part of the *18S rRNA* gene of *Theileria* spp. was conducted [43]. Primers and probe are shown in Table 2.

2.4. Agarose gel electrophoresis

Products derived from conventional PCRs were examined by gel electrophoresis (2% agarose gel, Top Vision Agarose, Fermentas, Germany) and stained with 0.01% GELRED™ (Biotium, Hayward, California) and detected using ultraviolet light (PeqLab, Erlangen, Germany).

2.5. Sequence analysis

PCR products were purified using minicolumns (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol and sent to an external laboratory (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany) for sequencing in both directions using the same primers as employed in PCR. The quality of the sequences was analysed with CHROMASLITE® and reverse sequences were reverse complemented (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html). Forward and reverse sequences were assembled with ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Sequences were compared with sequences available from the GenBank® database with the BLASTn tool of the National Center for Biotechnology (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.6. Statistical analysis

Data were entered in MSExcel tables (Microsoft Corporation, Redmont, Seattle, USA) and statistical analyses were performed using the program Prism 5 (GraphPad Prism®, La Jola, California, USA). Contingency table analysis using χ^2 -Test and Fisher's exact test was performed to test for associations of the prevalence of pathogens with host species, host age and gender or between pathogens. A significance level of $p = 0.05$ was used. Samples that tested positive for *Theileria* were not considered in the statistical analysis.

3. Results

3.1. *Anaplasma phagocytophilum*

Spleen samples from 303 of 364 (83.2%) wild ungulates tested positive for *A. phagocytophilum* DNA. *Anaplasma phagocytophilum* DNA was detected in all host species: 147 of 153 roe deer (96.1%), 31 of 43 fallow deer (72.1%) and 125 of 168 mouflon (74.4%) (Table 3). Roe deer tested significantly more often positive than fallow deer and mouflon, and prevalence of infection did not differ between fallow deer and mouflon (Table 4).

Overall prevalence of *A. phagocytophilum* infection did not differ between male and female wild ruminants (151/174, 86.7% vs. 139/174, 79.9%; $p=0.1131$). Analysis per host species confirmed this finding for both species of cervids, while in mouflon, males tested significantly more often positive than females (Table 5).

In total, 108 of 115 (93.9%) samples tested positive from animals of <1 year, 69 of 74 (93.2%) samples from animals of 1-2 years, and 113 of 158 (71.5%) samples from animals of >2 years. Animals of <1 year and 1-2 years of age tested significantly more often positive for *A. phagocytophilum* than older animals ($p<0.0001$). Analysis according to host species confirmed this finding for both mouflon and fallow deer, while for roe deer, prevalence was similar among animals of the three age categories (Table 6).

Fifty of the 303 (16.5%) samples that tested positive for *A. phagocytophilum* were further analysed for sequence variation in the partial *16S rRNA*-gene. Seven variants with 100% identity to sequences deposited in the GenBank database, and two new sequence variants were identified. The distribution of sequence variants among wild ruminant species is shown in Table 7. Sequences obtained in this study have been deposited in GenBank[®] under accession nos. KU510417-KU510435.

3.2. *Babesia* spp.

DNA of *Babesia* spp. was detected in the spleen tissue of 113 of the 364 (31.0%) animals. In total, 96 of 153 (62.7%) roe deer, 11 of 168 (6.5%); mouflon, and six of 43 (13.9%) fallow deer tested positive for *Babesia*.

Roe deer were significantly more often tested positive for *Babesia* spp. than fallow deer and mouflon, whereas the prevalence of infection did not differ between fallow deer and mouflon (Table 4).

The overall prevalence of *Babesia* spp. infection did not differ between male and female wild ruminants (53/174, 30.5% vs. 57/174, 32.8%; $p=0.7295$). Analysis per host species confirmed this finding for all three species (Table 5). Altogether, 43 of 115 (37.4%) samples were *Babesia* spp. positive from animals <1 year, 24 out of 74 (32.4%) samples from 1-2 years old animals and 43 out of 158 (27.2%)

samples from animals >2 years ($p=0.2009$). However, analysis per host species indicated an inverse relationship between the rate that roe deer tested positive for *Babesia* spp. test-positivity and the age of roe deer (Table 6).

The sequence data derived from 118 samples that tested positive revealed that:

- (1) 74 sequences of *B. capreoli* (in 65 roe deer and nine mouflon) with 72 sequences with 99-100% similarity to several GenBank® entries (e.g., accession nos. JN543179 from a roe deer in Austria, KP742785 from *I. persulcatus* nymphs in Latvia and KM657250 from a reindeer in Germany); the other two sequences were also similar to *B. capreoli*, but were very short;
- (2) 26 sequences of *Babesia* sp. EU1 (25 from roe deer and one from a mouflon) with 20 sequences with 99-100% similarity to GenBank® entries (e.g. KF724377 and KF500410 from a child and an *I. persulcatus* in China, KP072001 from an asymptomatic person in Poland, and KM657235 from a reindeer in Germany); six sequences were 86-98% similar to *Babesia* sp. EU1;
- (3) five sequences of *B. odocoilei*-like species in five fallow deer, with four sequences showing 99-100% and one sequence with 84% similarity to GenBank® entries from Germany (KM657254) and Austria (JN543180), and one sequence from one fallow deer with 99% similarity to *Babesia* sp. OO-2012 (JX0839789) from *I. ricinus* in Norway and 97% similarity to a *Babesia* species from an elk (*Cervus elaphus canadensis*) (KC460321);
- (4) seven sequences (from six roe deer and one mouflon) with similarities of 88-99% to several recognised *Babesia* species, but that could not be assigned a species name.

The distribution of the *Babesia* species among the wild ruminants is shown in Fig. 2. Co-infections with more than one *Babesia* species in an individual animal were not observed.

Sequences representing all *Babesia* species from the different animal species have been deposited in GenBank® database under accessions nos. KU351818-KU351828.

3.3. *Theileria* spp.

Four sequences derived from roe deer, all from Location 1, produced using the *Babesia* PCR were identical to a sequence (GenBank® accession no. AY421708) representing *Theileria* sp. 3185/02 from a red deer which was imported from Germany into Spain as well as *Theileria capreoli* (accession no. AY421708). Further analysis of amplicons produced using the *Theileria* PCR confirmed that they were all identical to the latter sequence. The sequence type of this study was deposited in GenBank database under accession number KU510437.

3.4. *Anaplasma phagocytophilum* + *Babesia* spp. co-infections

DNA of both *A. phagocytophilum* and *Babesia* spp. were detected in 109 of 364 (29.9%) wild ungulates. DNA of only one pathogen was detected in 198 (54.4%) samples: 194 (53.3%) samples tested positive for *A. phagocytophilum*, and four (1.1%) for *Babesia* spp. Fifty-seven of 364 samples (15.7%) tested negative for both pathogens.

Referring to the 307 animals that were infected with *A. phagocytophilum* and/or *Babesia* spp., the percentage of co-infections was 35.5%. Roe deer tested significantly more often positive (60.8%) than fallow deer and mouflon (11.6% and 6.5%, respectively), and the prevalence of infection did not differ between fallow deer and mouflon (Table 4). The overall prevalence of *A. phagocytophilum* + *Babesia* spp. co-infections did not differ between male and female wild ruminants (52/174, 29.9% vs. 54/174, 31.0%; $p=0.9073$).

Altogether, 42 of 115 (36.5%) samples tested positive for *A. phagocytophilum* + *Babesia* spp. co-infections from animals of <1 year, 24 of 74 (32.4%) animals of 1-2 years and 40 of 158 (25.3%) animals of >2 years of age ($p=0.1287$). However, analysis per host species indicated an inverse relationship between the rate of co-infection and age in roe deer (Table 6). For each age category, *A. phagocytophilum* + *Babesia* spp. co-infection was recorded significantly more often in roe deer than mouflon (Table 8). The same observation was made for the two genders - in both male and female animals, roe deer tested significantly more often positive than mouflon and fallow deer ($p<0.0001$), whereas there was no statistically significant difference between male and female animals of each host

species ($p > 0.05$). Considering all three species of wild ruminants, an analysis showed that the occurrence of both pathogens were not independent from one another ($p < 0.00001$). This finding indicates that *A. phagocytophilum* and *Babesia* spp. favour each other's presence, but no definite conclusion can be drawn as the time sequence of infections is unknown.

4. Discussion

4.1. *Anaplasma phagocytophilum*

The overall prevalence rate of 83.2% for *A. phagocytophilum* in the roe deer, mouflon and fallow deer in this study is comparable to results of studies in other wild ungulates in European countries like Slovenia or Norway, where infection rates of 86% and 87.5% were found in roe deer and red deer [45,46]. The prevalence of 96.1% for roe deer obtained in this study was higher than the rates reported in previous studies from other European countries, where prevalence rates ranged from 9.6% in Poland to 86% in Slovenia [45,47]. However, Overzier et al. (2013) and Scharf et al. (2011) found similarly high prevalence rates in Germany, with 98.9% and 94.0%, respectively [27,29].

The prevalence of 74.4% recorded in mouflon is higher than that obtained in other studies from Europe, where prevalence ranged from 4% in the Czech Republic to 50% in Slovakia and Austria [28,48,49]. Previous studies of fallow deer found prevalence rates ranging from 1.5% obtained in a study in Poland to 72.4% seen in a survey conducted in Italy [50,51]. Therefore, the detection rate in fallow deer in the present study of 72.1% falls into the upper range of previous detection rates. Animals in the present study were tested only once, at the time of culling. Therefore, no conclusion can be drawn as to the persistence of the pathogens in the animals or the time when the first infection occurred. However, the extremely low number of reports of clinical cases [52-54] contrasting the high prevalence of infection in wild ungulates strongly suggest that they are major hosts for *A. phagocytophilum* (cf. [48,55,56]), which is supported by the results of this study. Roe deer was significantly more often infected with *A. phagocytophilum* than mouflon and fallow deer were in this study, which strongly supports the proposal that roe deer is one of the main reservoirs for this tick-borne pathogen in Central Europe [3].

4.2. *Anaplasma phagocytophilum* variants

Nine variants of the partial *16S rRNA* gene of *A. phagocytophilum* were detected in this study. Variant “B” has been identified as the prototype variant of the Human Granulocytic Anaplasmosis agent and was found previously in Europe and the USA in humans (GenBank® accession nos. U02521, GU236658, GU236659), but was also found in horses (EU839852, AF482761, AF057707, U77389, GU236716), dogs (AF507941, U10873, FJ829787, EU847530), and several species of wild ruminant (GU236579, FJ812389, FJ812388, EU939848, EU839850, GU236644, GU236625). Contrary to Overzier et al. (2013) we did not detect this variant in roe deer, but in mouflon and fallow deer [27]. Variant “W” was identified in clinical cases of tick-borne fever in ruminants in Europe [3,57] and was found in roe deer and mouflon in this study. In roe deer, only few animals were infected with this variant, whereas in mouflon, nearly 40% of the sequenced samples were this variant. Considering the results on both pathogenic variants “B” and “W”, wild ruminants may contribute to endemic cycles with variants pathogenic for ruminants, domestic animals, and also for humans. Furthermore, it may be studied whether mouflon, being an ovine species, may develop clinical signs of tick-borne fever like sheep.

The variants “X” and “Y” were previously detected, for example, in roe deer (GenBank® accession nos. FJ812403-812405, EU839847, AF481854, AF384213, FJ538288) (FJ812406-812408, GU236571, HM480385), mouflon (FJ812409) and goat (FJ538289) and occurred also in all host species examined in this study. These variants have not yet been described in clinical cases of granulocytic anaplasmosis.

Variants “I” (GenBank® accession nos. HM480377 and HM480383) and “V” (FJ788512), which have been identified in this study in roe deer only, were detected previously in roe deer. Variant “S” was previously found in red deer, roe deer and ibex (GenBank® accession nos. FJ812391-812397), dog (FJ829790) and horse (JF893934) and was found in mouflon and fallow deer in this study. Separation into genetic lineages associated to wild ruminants or domesticated animals and into more generalist variants associated to both have been shown previously (e.g., [8, 28-30]). However, the *16S rRNA* gene is highly conserved and genetic variability and host association hypotheses on basis of this gene in *A.*

phagocytophilum should be regarded with reservation only.

4.3. *Babesia* spp.

The average prevalence of *Babesia* spp. of 31.0 % is comparable to previous studies in wild ungulates in Europe, even though the variety of *Babesia* spp. (differing depending on ungulate host studied) makes a direct comparison with the present study difficult. For example, values for individual *Babesia* species ranged from 0.3% (*Babesia* sp. EU1) to 54.9% (*B. divergens*) [32,35,38,58]. However, the prevalence rate for *Babesia* spp. in roe deer alone (62.8%) in the present study was higher than that recorded in most past studies, except for a study from Southern Germany where a prevalence of 89.5% was estimated from testing spleen tissue from 95 roe deer of a single hunting ground [27]. In other studies [32,35,38,59], roe deer showed variable prevalence rates for different *Babesia* species, for example 26% in Switzerland for *B. capreoli* or 0.3% and 21.6% for *Babesia* sp. EU1 in Italy and Slovenia, respectively.

This is the first description of the occurrence of DNA of *B. capreoli* and *Babesia* sp. EU1 in mouflon in Europe. Previously, anti-*B. ovis* antibodies were detected in serum from mouflon [60], and '*Babesia* sp.' was reported for a mouflon in Portugal [61].

The prevalence of *Babesia* spp. in roe deer was significantly higher than in mouflon and fallow deer. This finding supports the hypothesis that roe deer may be a natural reservoir for *Babesia* species, especially for *B. capreoli*, which represents most of *Babesia* spp. infections in this study. In fallow deer in this study, DNA of a *B. odocoilei*-like taxon, formerly found in Switzerland, was detected (cf. [62]). In Germany, this is the first report of DNA of any *Babesia* species in fallow deer.

4.4. *Theileria* spp.

Four PCR products obtained from roe deer from the location Schlaubetal, Brandenburg, matched with the sequence of one *Theileria* strain, which was detected in a red deer in Spain which was imported from Germany [63].

Interestingly, in spleen tissue from a red deer calf from the same location, the partial *18S rRNA* gene was also sequenced (accession no. KU510436) and was determined as *Theileria* sp. ZS T04 (DQ520836) (Kauffmann et al., unpublished data). This *Theileria* has been detected recently in red deer in Austria [64]. Whether there are more *Theileria* spp. circulating in Germany, whether the same *Theileria* spp. exist in Spain or Austria or whether all this is a local, occasional finding would require further studies.

4.5. Co-infections

Infections with both *A. phagocytophilum* and *Babesia* spp. existed in 30.0% of all animals tested; for roe deer alone, this rate was significantly higher (60.8%) than for the other animal species investigated here. Co-infections have been detected previously in roe deer in Germany and several wild ungulates in Austria [27,37], and also strongly support that these animals are major hosts for the pathogens investigated here, whereas a previous study of chamois in Switzerland revealed no co-infections [65].

4.6. Conclusion

Both *A. phagocytophilum* and *Babesia* species were detected in all wild ruminant species tested, partially with high infection rates and a wide distribution over the investigated locations in Germany. Roe deer were infected as well as co-infected with the tick-borne pathogens studied, with significantly higher rates than in fallow deer and mouflon. *Anaplasma phagocytophilum* showed a high variability in the occurrence of genetic variants, and suggests that wild ungulates might contribute to endemic cycles of these variants.

Acknowledgements

The authors thank the sample collectors for their invaluable help in taking the samples. In addition special thanks to Claudia Thiel and Tim Tiedemann for technical assistance in laboratory. Monia Grimm (Statistical Consulting Unit, LMU Munich) is acknowledged for helpful statistical advice. The work of Cornelia Silaghi was done under the frame of COST Action TD1303 (EurNegVec).

Disclaimer

This document is provided for scientific purposes only. Any reference to a brand or trademark is for informational purposes only and is not intended for a commercial purpose or to dilute the rights of the respective owner(s) of brand(s) or trademark(s). All marks are the property of their respective owners.

References

- [1] J.M. Medlock, K.M. Hansford, A. Bormane, M. Derdakova, A. Estrada-Pena, J.C. George, I. Golovljova, T.G. Jaenson, J.K. Jensen, P.M. Jensen, M. Kazimirova, J.A. Oteo, A. Papa, K. Pfister, O. Plantard, S.E. Randolph, A. Rizzoli, M.M. Santos-Silva, H. Sprong, L. Vial, G. Hendrickx, H. Zeller, W. Van Bortel, Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit Vectors*. 6 (2013), 1.
- [2] A. Rizzoli, C. Silaghi, A. Obiegala, I. Rudolf, Z. Hubálek, G. Földvári, O. Plantard, M. Vayssier-Taussat, S. Bonnet, E. Spitalská, M. Kazimírová, *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. *Front Public Health*. 1 (2014) 251.
- [3] S. Stuen, E.G. Granquist, C. Silaghi, *Anaplasma phagocytophilum*--a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers cellular infection microbiol* 3 (2013) 31.
- [4] A. Hildebrandt, J.S. Gray, K.P. Hunfeld, Human babesiosis in Europe: what clinicians need to know. *Infection*. 41(6) (2013) 1057-1072.
- [5] K. Häselbarth, A.M. Tenter, V. Brade, G. Krieger, K.P. Hunfeld, First case of human babesiosis in Germany - Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. *Int J Med Microbiol* 297 (2007) 197-204.
- [6] A. Hildebrandt, K.P. Hunfeld, M. Baier, A. Krumbholz, S. Sachse, T. Lorenzen, M. Kiehntopf, H.J. Fricke, E. Straube, First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 26 (2007), 595-601.
- [7] B. Víchová, V. Majláthová, M. Nováková, M. Stanko, I. Hviščová, L. Pangráčová, T. Chrudimský, J. Čurlík, B. Petko, *Anaplasma* infections in ticks and reservoir host from Slovakia. *Infect Genet Evol*. 22 (2014) 265-272.

- [8] S. Jahfari, E.C.Coipan, M. Fonville, A.D. van Leeuwen, P. Hengeveld, D. Heylen, P. Heyman, C. van Maanen, C.M. Butler, G. Földvári, S. Szekeres, G. van Duijvendijk, W. Tack, J.M. Rijks, J. van der Giessen, W. Takken, S. E. van Wieren, K. Takumi, H. Sprong. Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. *Parasit Vectors*. 7 (2014) 365.
- [9] C. Silaghi, J. Skuballa, C. Thiel, K. Pfister, T. Petney, M. Pfäffle, H. Taraschewski, L.M. Passos, The European hedgehog (*Erinaceus europaeus*)--a suitable reservoir for variants of *Anaplasma phagocytophilum*? *Ticks Tick Borne Dis*.3 (2012,) 49-54.
- [10] K.J. Bown, X. Lambin, G. Telford, D. Heyder-Bruckner, N.H. Ogden, R.J.Birtles. The common shrew (*Sorex araneus*): a neglected host of tick-borne infections? *Vector Borne Zoonotic Dis*. 11(2011) 947-953.
- [11] A. Obiegala, M. Pfeffer, K. Pfister, T. Tiedemann, C. Thiel, A. Balling, C. Karnath, D. Woll, C. Silaghi, *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis and *Anaplasma phagocytophilum*: prevalences and investigations on a new transmission path in small mammals and ixodid ticks. *Parasit Vectors*. 7 (2014) 563.
- [12] G. Földvári, S. Jahfari, K. Rigó, M. Jablonszky, S. Szekeres, G. Majoros, M. Tóth, V. Molnár, E.C. Coipan, H. Sprong. *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis and *Anaplasma phagocytophilum* in urban hedgehogs. *Emerg Infect Dis*. 20(2014) 496-498.
- [13] J. Groen, P. Koraka, Y.A. Nur, T. Avsic-Zupanc, W.H. Goessens, A. Ott, A.D. Osterhaus, Serologic evidence of ehrlichiosis among humans and wild animals in The Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 21 (2002) 46-49.
- [14] M. Petrovec, W. Sixl, R. Schweiger, S. Mikulasek, L. Elke, G. Wust, E. Marth, K. Strasek, D. Stunzner, T. Avsic-Županc, Infections of wild animals with *Anaplasma phagocytophila* in Austria and the Czech Republic. *Ann N Y Acad Sci*. 990 (2003) 103-106.

- [15] M.P. Ryser-Degiorgis, R. Hofmann-Lehmann, C.M. Leutenegger, C.H. Segerstad, T. Morner, R. Mattsson, H. Lutz, Epizootiologic investigations of selected infectious disease agents in free-ranging Eurasian lynx from Sweden. *J Wildl Dis.* 41 (2005) 58-66.
- [16] M. Leschnik, G. Kirtz, Z. Virányi, W. Wille-Piazzai, G. Duscher, Acute granulocytic anaplasmosis in a captive timber wolf (*Canis lupus occidentalis*). *J Zoo Wildl Med.* 43 (2012) 645-648.
- [17] V. Härtwig, FD von Loewenich, C. Schulze, R.K. Straubinger, A. Dauschies, V. Dyachenko. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) and raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) from Brandenburg, Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 5 (2014) 277-280.
- [18] M.O. Dumitrache, I.A. Matei, A.M. Ionică, Z. Kalmár, G. D'Amico, S. Sikó-Barabási, D. T. Ionescu, C.M. Gherman, A. D. Mihalca. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Romania. *Parasit Vectors.* 8 (2015) 514.
- [19] B. Vichová, V. Majlathová, M. Nováková, M. Straka, B. Pet'ko, First molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in European brown bear (*Ursus arctos*). *Vector Borne Zoonotic Dis* 10 (2010) 543-545.
- [20] A. Harrison, K.J. Bown, W.I. Montgomery. *Anaplasma phagocytophilum* in feral goats in Northern Ireland. *Vet Rec.* 170 (2012) 602-603.
- [21] C. Silaghi, K. Pfister, E. Overzier, Molecular investigation for bacterial and protozoan tick-borne pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) from southern Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 14 (2014) 371-373.
- [22] G. Karbowski, B. Vichová, J. Werszko, A.W. Demiaszkiewicz, A.M. Pyziel, H. Sytykiewicz, T. Szewczyk, B. Pet'ko. The infection of reintroduced ruminants - *Bison bonasus* and *Alces alces* - with *Anaplasma phagocytophilum* in northern Poland. *Acta Parasitol.* 60 (2015), 645-648.

- [23] E.G. Granquist, M. Kristiansson, P.E. Lindgren, A. Matussek, A. Nødtvedt, W. Okstad, S. Stuen. Evaluation of microbial communities and symbionts in *Ixodes ricinus* and ungulate hosts (*Cervus elaphus* and *Ovis aries*) from shared habitats on the west coast of Norway. *Ticks Tick Borne Dis.* 5 (2014) 780-784.
- [24] J. de la Fuente, F. Ruiz-Fons, V. Naranjo, A. Torina, O. Rodriguez, C. Gortazar, Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. *Res Vet Sci.* 84 (2008) 382-386.
- [25] F. Veronesi, R. Galuppi, M.P. Tampieri, C. Bonoli, R. Mammoli, D. Piergili Fioretti. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in fallow deer (*Dama dama*) and feeding ticks from an Italy preserve. *Res Vet Sci.* 90 (2011) 40-43.
- [26] C. Silaghi, D. Hamel, C. Thiel, K. Pfister, L.M. Passos, S. Rehbein, Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in wild caprine and cervid ungulates from the Alps in Tyrol, Austria. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11 (2011) 355-362.
- [27] E. Overzier, K. Pfister, I. Herb, M. Mahling, G. Böck Jr., C. Silaghi, Detection of tick-borne pathogens in roe deer (*Capreolus capreolus*), in questing ticks (*Ixodes ricinus*), and in ticks infesting roe deer in southern Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 4 (2013) 320-328.
- [28] C. Silaghi, G. Liebisch, K. Pfister, Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases. *Parasit Vectors.* 4 (2011) 161.
- [29] W. Scharf, S. Schauer, F. Freyburger, M. Petrovec, D. Schaarschmidt-Kiener, G. Liebisch, M. Runge, M. Ganter, A. Kehl, J.S. Dumler, A.L. Garcia-Perez, J. Jensen, V. Fingerle, M.L. Meli, A. Ensser, S. Stuen, F.D. von Loewenich, Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum ankA* gene clusters. *J Clin Microbiol.* 49 (2011) 790-796.

- [30] C. Huhn, C. Winter, T. Wolfsperger, N. Wüppenhorst, K. Strašek Smrdel, J. Skuballa, M. Pfäffle, T. Petney, C. Silaghi, V. Dyachenko, N. Pantchev, R.K. Straubinger, D. Schaarschmidt-Kiener, M. Ganter, M.L. Aardema, F.D. von Loewenich. Analysis of the population structure of *Anaplasma phagocytophilum* using multilocus sequence typing. PLoS One. 9 (2014) e93725.
- [31] J. de la Fuente, R.F. Massung, S.J. Wong, F.K. Chu, H. Lutz, M. Meli, F.D. von Loewenich, A. Grzeszczuk, A. Torina, S. Caracappa, A.J. Mangold, V. Naranjo, S. Stuen, K.M. Kocan, Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. J Clin Microbiol. 43 (2005) 1309-1317.
- [32] D. Duh, M. Petrovec, A. Bidovec, T. Avsic-Zupanc, Cervids as *Babesiae* hosts, Slovenia. Emerg Infect Dis. 11 (2005) 1121-1123.
- [33] K. Enigk, K. Friedhoff, *Babesia capreoli* in the roe deer (*Capreolus capreolus*) Z Tropenmed Parasitol.13 (1962) 8-20.
- [34] K. Enigk, K. Friedhoff,, On the host specificity of *Babesia divergens* (*Piroplasmidea*) Z Parasitenkd.21 (1962) 238-256.
- [35] M.P. Tampieri, R. Galuppi, C. Bonoli, G. Cancrini, A. Moretti, M. Pietrobelli, Wild ungulates as *Babesia* hosts in northern and central Italy. Vector Borne Zoonotic Dis. 8 (2008) 667-674.
- [36] S. Zanet, A. Trisciuglio, E. Bottero, I.G. de Mera, C. Gortazar, M.G. Carpignano, E. Ferroglio, Piroplasmosis in wildlife: *Babesia* and *Theileria* affecting free-ranging ungulates and carnivores in the Italian Alps. Parasit Vectors. 7 (2014) 70.
- [37] C. Silaghi, D. Hamel, K. Pfister, S. Rehbein, *Babesia* species and co-infection with *Anaplasma phagocytophilum* in free-ranging ungulates from Tyrol, Austria. Wiener Tierärztliche Monatsschrift 98 (2011) 268-274.
- [38] A.O. Michel, A. Mathis, M.P. Ryser-Degiorgis, *Babesia* spp. in European wild ruminant species: parasite diversity and risk factors for infection. Vet Res. 45 (2014) 65.

- [39] R.F. Massung, K. Slater, J.H. Owens, W.L. Nicholson, T.N. Mather, V.B. Solberg, J.G. Olson, Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *J Clin Microbiol.* 36 (1998) 1090-1095.
- [40] 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.
- [41] S. Schorn, K. Pfister, H. Reulen, M. Mahling, C. Silaghi, Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Parasit Vectors.* 4 (2011) 135.
- [42] L. Malandrini, M. Jouglin, Y. Sun, N. Brisseau, A. Chauvin, Redescription of *Babesia capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962) from roe deer (*Capreolus capreolus*): isolation, cultivation, host specificity, molecular characterisation and differentiation from *Babesia divergens*. *Int J Parasitol.* 40 (2010) 277-284.
- [43] M. Sawczuk, A. Maciejewska, B. Skotarczak, Identification and molecular characterization of *Theileria* sp infecting red deer (*Cervus elaphus*) in northwestern Poland. *Europ J Wildlife Res.* 54 (2008) 225-230.
- [44] J.W. Courtney, L-M. Kostelnik, N.S. Zeidner, R.F. Massung, Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol.* 42 (2004) 3164-3168.
- [45] M. Petrovec, A. Bidovec, J.W. Sumner, W.L. Nicholson, J.E. Childs, T. Avsic-Zupanc, Infection with *Anaplasma phagocytophila* in cervids from Slovenia: evidence of two genotypic lineages. *Wien Klin Wochenschr.* 114 (2002) 641-647.
- [46] S. Stuen, K.S. Pettersen, E.G. Granquist, K. Bergström, K.J. Bown, R.J. Birtles, *Anaplasma phagocytophilum* variants in sympatric red deer (*Cervus elaphus*) and sheep in southern Norway. *Ticks Tick Borne Dis.* 4 (2013) 197-201.
- [47] J. Michalik, J. Stanczak, M. Racewicz, S. Cieniuch, B. Sikora, A. Szubert-Kruszynska, R. Grochowalska, Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in wild cervids and feeding *Ixodes ricinus* ticks from west-central Poland. *Clin Microbiol Infect.* 15 Suppl 2 (2009) 81-83.

- [48] K. Stefanidesova, E. Kocianova, V. Boldis, Z. Kostanova, P. Kanka, D. Nemethova, E. Spitalska, Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* infection in free-ranging ungulates in central Slovakia. *Europ Jl Wildlife Res.* 54 (2008) 519-524.
- [49] P. Zeman, M. Pecha, Segregation of genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* circulating among wild ruminants within a Bohemian forest (Czech Republic). *Int J Med Microbiol.* 298 (2008) 203-210.
- [50] J. Hapunik, B. Vichova, G. Karbowski, I. Wita, M. Bogdaszewski, B. Pet'ko, Wild and farm breeding cervids infections with *Anaplasma phagocytophilum*. *Ann Agric Environ Med.* 18 (2011) 73-77.
- [51] V.V. Ebani, D. Cerri, F. Fratini, M. Ampola, E. Andreani. *Anaplasma phagocytophilum* infection in a fallow deer (*Dama dama*) population in a preserve of central Italy. *New Microbiol.* 30 (2007) 161-165.
- [52] A. Jenkins, K. Handeland, S. Stuen, L. Schouls, I. van de Pol, R.T. Meen, B.E. Kristiansen, Ehrlichiosis in a moose calf in Norway. *J Wildl Dis.* 37 (2001) 201-203.
- [53] S. Stuen, E.O. Engvall, I. van de Poll, L.M. Schouls, Granulocytic ehrlichiosis in a roe deer calf in Norway. *J Wildl Dis.* 37 (2001) 614-616.
- [54] S. Stuen, T. Moum, A. Bernhoft, S.Vene, A parietic condition in an *Anaplasma phagocytophilum* infected roe deer calf. *J Wildl Dis.* 42 (2006) 170-174.
- [55] M.P. Alberdi, A.R. Walker, K.A. Urquhart, Field evidence that roe deer (*Capreolus capreolus*) are a natural host for *Ehrlichia phagocytophila*. *Epidemiol Infect* 124 (2000) 315-323.
- [56] J.S. Liz, J.W. Sumner, K. Pfister, M. Brossard, PCR detection and serological evidence of granulocytic ehrlichial infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*). *J Clin Microbiol.* 40 (2002) 892-897.

- [57] M. Nieder, C. Silaghi, D. Hamel, K. Pfister, R. Schmäschke, M. Pfeffer, Tick-borne fever caused by *Anaplasma phagocytophilum* in Germany: first laboratory confirmed case in a dairy cattle herd. *Tierärztl Prax. G* 40 (2012) 101-106.
- [58] S. Bonnet, M. Jouglin, M. L'Hostis, A. Chauvin, *Babesia* sp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*. *Emerg Infect Dis.* 13 (2007) 1208-1210.
- [59] S. Hoby, A. Mathis, M.G. Doherr, N. Robert, M.P. Ryser-Degiorgis, *Babesia capreoli* infections in alpine chamois (*Rupicapra r. Rupicapra*), roe deer (*Capreolus c. capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) from Switzerland. *J Wildl Dis.* 45 (2009) 748-753.
- [60] D. Ferrer, J. Castella, J.F. Gutierrez, S. Lavin, I. Marco, Seroprevalence of *Babesia ovis* in mouflon sheep in Spain. *JWildIDis.* 34 (1998) 637-639.
- [61] M. Maia, M.J. Vila Viçosa, A.J.L. Simões, V. Caeiro, Endoparasitas da fauna silvestre raramente ou não assinalados em Portugal. *Acta Parasitol. Portuguesa* 2 (1999) 23-25.
- [62] H. Hilpertshauser, P. Deplazes, M. Schnyder, L. Gern, A. Mathis, *Babesia* spp. identified by PCR in ticks collected from domestic and wild ruminants in southern Switzerland. *Appl Environ Microbiol.* 72 (2006) 6503-6507.
- [63] U. Höfle, J. Vicente, D. Nagore, A. Hurtado, A. Estrada-Pena, J. de la Fuente, C. Gortazar, The risks of translocating wildlife. Pathogenic infection with *Theileria* sp. and *Elaeophora elaphi* in an imported red deer, *Vet Parasitol.* 126 (2004) 387-395
- [64] H.P. Fuehrer, N. Biro, J. Harl, H.L. Worliczek, C. Beiglbock, R. Farkas, A. Joachim, G.G. Duscher, Molecular detection of *Theileria* sp. ZS TO4 in red deer (*Cervus elaphus*) and questing *Haemaphysalis concinna* ticks in Eastern Austria. *Vet Parasitol.* 197 (2013) 653-657.
- [65] S. Hoby, N. Robert, A. Mathis, N. Schmid, M.L. Meli, R. Hofmann-Lehmann, H. Lutz, P. Deplazes, M.P. Ryser-Degiorgis, Babesiosis in free-ranging chamois (*Rupicapra r. rupicapra*) from Switzerland. *Vet Parasitol.* 148 (2007) 341-345.

Figure legends

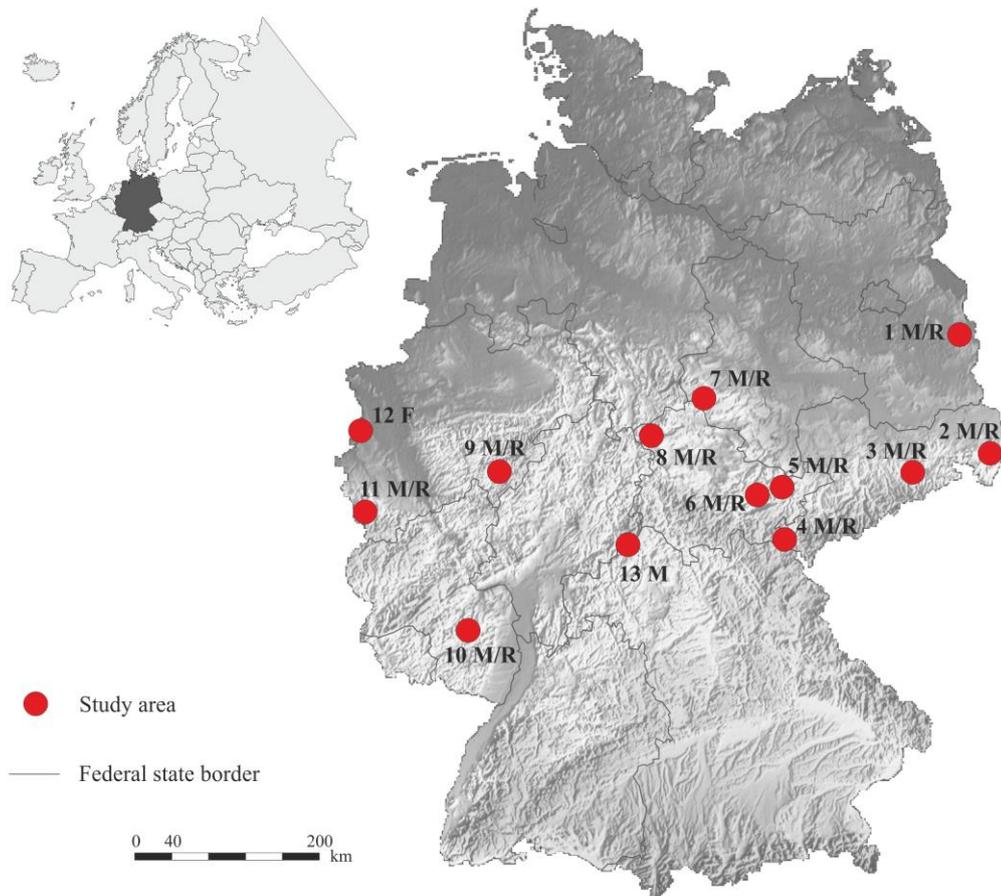


Fig. 1. Sampling locations: 1 = Schlaubetal, Brandenburg; 2 = Königshainer Berge, Saxony; 3 = Osterzgebirge, Saxony; 4 = Vogtland, Saxony; 5 = Reinstädter Grund, Thuringia; 6 = Stadtroda, Thuringia; 7 = Ostharz, Saxony-Anhalt; 8 = Eichsfeld, Thuringia; 9 = Wittgensteiner Land, North Rhine-Westphalia; 10 = Donnersberg, Rhineland-Palatinate; 11 = Eifel, North Rhine-Westphalia; 12 = Brügggen-Bracht, North Rhine-Westphalia; 13 = Rhön, Hesse; F = fallow deer (*Dama dama*); M = mouflon (*Ovis orientalis musimon*); R = roe deer (*Capreolus capreolus*).

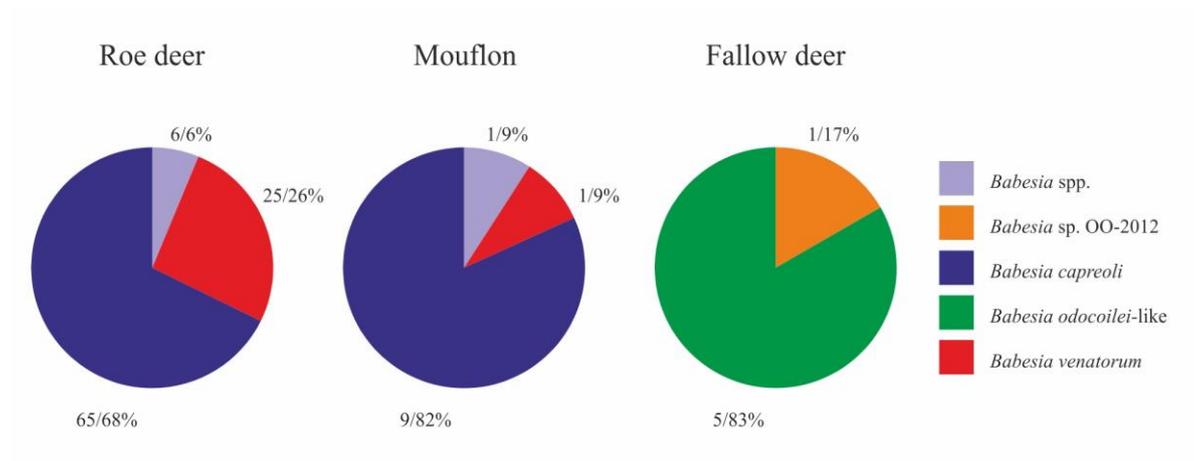


Fig. 2. Distribution of *Babesia* species in the three species of wild ruminants in Germany.

Table 1

Details of the wild ruminants investigated for *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. in Germany

Location ¹	Roe deer									Mouflon									Fallow deer									All Animals
	Sex ²			Age (years) ³						Sex ²			Age (years) ³						Sex ²			Age (years) ³						
	All	M	F	?	<1	1- 2	>2	?	All	M	F	?	<1	1- 2	>2	?	All	M	F	?	<1	1- 2	>2	?				
1	23	8	15	-	6	1	16	-	2	2	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25			
2	3	2	1	-	-	1	2	-	12	6	6	-	3	5	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15			
3	13	7	5	1	4	6	2	1	12	6	3	3	7	3	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	25			
4	9	2	7	-	5	-	3	1	16	7	9	-	4	4	6	2	-	-	-	-	-	-	-	-	25			
5	7	5	2	-	-	3	4	-	20	13	7	-	3	6	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27			
6	13	6	7	-	2	6	5	-	10	7	3	-	1	3	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23			
7	31	10	20	1	12	9	10	-	17	8	9	-	5	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48			
8	17	8	9	-	6	3	8	-	18	12	6	-	8	3	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35			
9	5	1	4	-	1	-	4	-	1	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6			
10	4	1	-	3	1	-	-	3	7	2	-	5	1	1	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	11			
11	28	17	11	-	9	5	14	-	38	27	11	-	10	8	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66			
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43	12	28	3	19	3	17	4	43			
13	-	-	-	-	-	-	-	-	15	4	11	-	6	4	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15			
Total	153	67	81	5	46	34	68	5	168	95	65	8	50	37	73	8	43	12	28	3	19	3	17	4	364			

¹ For details of location refer to Figure 1

² M=male, F=female, ?=sex not known

³ <1=less than one year (fawn or lamb), 1-2=yearling (between one and two years old), >2=more than 2 years old; ?=age not known

Table 2

Primers used for detection and identification of *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp. and *Theileria* spp.

PCR – target gene	Name	Direction	Primer sequences	Amplicon length	Reference
<i>Msp2</i> (<i>A. phagocytophilum</i>)	ApMsp2f	forward	5'-ATGGAAGGTAGTGTGGTTATGGTATT-3'	77 bp	[44]
	ApMsp2r	reverse	5'-TTGGTCTTGAAGCGCTCGTA-3'		
	ApMsp2p	probe	5'-TGGTGCCAGGGTTGAGCTTGAGATTG-3' labelled with FAM-TAMRA		
<i>16S rRNA</i> – 1. Amplification (<i>A. phagocytophilum</i>)	ge3a	forward	5'-CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC -3'	932 bp	[39]
	ge10r	reverse	5'-TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC -3'		
<i>16S rRNA</i> – 2. Amplification (<i>A. phagocytophilum</i>)	ge9f	forward	5'-AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT -3'	497 bp	[39]
	ge2	reverse	5'-GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG -3'		
<i>18S rRNA</i> (<i>Babesia</i> spp.)	BJ1	forward	5'-GTCTTGTAATTGGAATGATGG-3'	411-452bp	[40]
	BN2	reverse	5'-TAGTTTATGGTTAGGACTACG-3'		
<i>18S rRNA</i> (<i>Theileria</i> spp.)	TH for	forward	5'-TGACACAGGGAGGTAGTGA-3'	650 bp	[43]
	TH rev	reverse	5'-TCAGCCTTGCGACCATACT-3'		

Table 3

Results of the Polymerase Chain Reaction Tests for detection of DNA of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. in three species of wild ruminants in Germany

Location ¹	Roe deer				Mouflon				Fallow deer						
	total	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> positive		<i>Babesia</i> spp. positive		total	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> positive		<i>Babesia</i> spp. positive		total	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> positive		<i>Babesia</i> spp. positive	
		%	%	%	%		%	%	%	%		%	%	%	
1	23	21	91.3	11 ²	47.8	2	2	100	1	50.0	--				
2	3	3	100	1	33.3	12	10	83.3	0	0	--				
3	13	12	92.3	8	61.5	12	9	75.0	2	16.7	--				
4	9	8	88.9	6	66.7	16	12	75.0	2	12.5	--				
5	7	7	100	7	100	20	18	90.0	0	0	--				
6	13	12	92.3	8	61.5	10	8	80.0	4	40.0	--				
7	31	30	96.8	19	61.3	17	8	47.1	1	12.5	--				
8	17	17	100	9	52.9	18	16	88.9	0	0	--				
9	8	8	100	6	75.0	2	1	50.0	0	0	--				
10	4	4	100	2	50.0	7	7	100	1	5.9	--				
11	25	25	100	19	76.0	37	25	67.6	0	0	--				
12	--					--					43	31	72.1	6	13.9
13	--					15	9	60.0	0	0	--				
Total	153	147	96.1	96	62.8	168	125	74.4	11	6.5	43	31	72.1	6	13.9

¹ For details of Location refer to Figure 1

² Additionally four roe deer were positive for *Theileria* spp. 3185/02 in Location 1

Table 4

Correlation of occurrence of DNA of *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* + *Babesia* spp. co-infection in three species of wild ruminants in Germany

	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>Babesia</i> spp.	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> + <i>Babesia</i> spp. co-infection
	positive/total	positive/total	positive/total
Roe deer	147/153 ^a	96/153 ^a	93/153 ^a
Mouflon	125/168 ^b	11/168 ^b	11/168 ^b
Fallow deer	31/43 ^b	6/43 ^b	5/43 ^b
χ^2 -Test	p < 0.0001	p < 0.0001	p < 0.0001

^{a,b} Values with different superscript character within column differ significantly (p < 0.05, Fisher's exact test)

Table 5

Correlation of occurrence of DNA of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. and gender of the three species of wild ruminants in Germany

	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>			<i>Babesia</i> spp.		
	Male positive total	Female positive total	Fisher's exact test	Male positive total	Female positive total	Fisher's exact test
Roe Deer	66/67	76/81	p = 0.2219	44/65	51/81	p = 0.8634
Mouflon	75/95	42/65	p = 0.0484	7/95	2/65	p = 0.3128
Fallow Deer	10/12	21/28	p = 0.6969	2/12	4/24	p = 1.000

Table 6

Correlation of occurrence of DNA of *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* + *Babesia* spp. co-infections in three species of wild ruminants in Germany, by age within host species

Pathogen	Age ¹	Roe deer positive/total	Mouflon positive/total	Fallow deer positive/total
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<1	45/46	44/50 ^a	19/19 ^a
	1-2	34/34	32/37 ^a	3/3 ^a
	>2	63/68	41/73 ^b	9/17 ^b
	χ^2 -Test	p = 0.1528	p < 0.0001	p < 0.0001
<i>Babesia</i> spp.	<1	36/46 ^a	3/50	4/19
	1-2	20/34 ^{a,b}	4/37	0/3
	>2	38/68 ^b	3/73	2/17
	χ^2 -Test	p = 0.0418	p = 0.3888	NC ²
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> + <i>Babesia</i> spp.	<1	35/46 ^a	3/50	4/19
	1-2	20/34 ^{a,b}	4/37	0/3
	>2	36/68 ^b	3/73	1/17
	χ^2 -Test	p = 0.0420	p = 0.3888	NC

¹ <1=less than one year (fawn or lamb), 1-2=yearling (between one and two years old), >2=more than 2 years old

² NC = not calculated due to low case numbers

^{a,b} Values with different superscript character within column differ significantly (p < 0.05) in Fisher's-Test

Table 7

Variants of the partial *16S rRNA* gene of 54 sequenced *Anaplasma phagocytophilum* in three species of wild ruminants in Germany

Variant	Total	Roe deer	Mouflon	Fallow deer
B	7		4	3
I	2	2		
S	6		4	2
V	1	1		
W	9	2	7	
X	8	7	1	
Y	16	14	1	1
New variants	2	1	1	
Total	51	26	18	6

Table 8

Occurrence of *Anaplasma phagocytophilum* + *Babesia* spp. co-infections versus single *A. phagocytophilum* infections; by age

Age ¹	Roe deer	Mouflon	Fisher's exact test
	Positive Co-infection/ single infection ²	Positive Co-infection/ single infection	
<1	35/10	3/41	p < 0.0001
1-2	20/14	4/28	p < 0.0001
>2	36/27	3/38	p < 0.0001
χ^2 -Test	p = 0.0674	p = 0.6417	

¹ <1=less than one year, 1-2=yearling (between one and two years old), >2=more than 2 years old

² *A. phagocytophilum* + *Babesia* spp. co-infection/*A. phagocytophilum* infection

V. DISKUSSION

1. *Anaplasma phagocytophilum*

Die molekularbiologisch nachgewiesene Prävalenz von insgesamt 83,2% für *A. phagocytophilum* in den untersuchten Wildtieren ist vergleichbar mit Ergebnissen aus anderen Studien in Europa wie zum Beispiel in Slowenien und Norwegen. Dort wurden Infektionsraten von 86% bzw. 87,5% in Rehwild und Rotwild nachgewiesen (Petrovec et al., 2002; Stuen et al., 2013b). Betrachtet man nur die Prävalenz für Rehwild von 96,1%, dann liegt diese höher als in früheren Studien berichtet wurde, in denen die Werte zwischen 9,6% in Polen und 86% in Slowenien lagen (Di Domenico et al., 2016; Jahfari et al., 2014; Michalik et al., 2009; Petrovec et al., 2002; Silaghi et al., 2011a). In Deutschland jedoch wurden auch schon früher ähnliche Befallsraten in Höhe von 98,9%, 94,0% und 90,3% festgestellt (Overzier et al., 2013a; Scharf et al., 2011; Schauer, 2008). Auch eine aktuelle Studie aus Frankreich zeigte mit 95,2% ähnlich hohe Prävalenzen für *A. phagocytophilum* im Reh (Dugat et al., 2016). Es fällt auf, dass in aktuelleren Studien insgesamt die Prävalenzen höher zu liegen scheinen, als in den ersten Veröffentlichungen, was entweder für eine weitere Verbreitung von *A. phagocytophilum* („emerging pathogen“) in den letzten Jahren spricht oder dafür, dass die Nachweismöglichkeiten sich verbessert haben und heutzutage sensitiver sind und somit auch geringe Erregermengen detektiert werden können. Ein Grund für die starken Schwankungen könnte, neben dem lokalen Auftreten des Erregers auch in den unterschiedlichen Untersuchungsmethoden liegen, die sich in ihrer Sensitivität unterscheiden können. Ebenso wurden teils unterschiedliche Probenarten untersucht (Haut, Blut, Milzproben). In einer Studie wurde bei Wildwiederkäuern aus Blutproben serologisch eine Prävalenz von 100% nachgewiesen, von den gleichen Tieren wurden auch Blut und Milzproben mittels PCR untersucht. Die Prävalenzen schwanken bei diesem Nachweis zwischen 4% und 86% und stimmen beim Vergleich von Blut und Gewebe durch PCR nur zu 71% überein (Zeman und Pecha, 2008).

Die molekularbiologische Prävalenz von 74% für Muffelwild lag wiederum höher als in früheren Studien aus Europa, in denen die Prävalenzraten zwischen 4% bzw. 13,3% in der Tschechischen Republik und 50,0% in Österreich und der

Slowakei lagen (Silaghi et al., 2011b; Stefanidesova et al., 2008; Zeman und Pecha, 2008).

Frühere Studien beim Damwild ergaben Nachweisraten von *A. phagocytophilum* zwischen 1,5% in Polen und 72,1% in Italien (Ebani et al., 2007; Hapunik et al., 2011). Damit verglichen lag die Prävalenz von 72,1% in dieser Studie für Damwild im oberen Bereich.

Männliche Tiere zeigten beim Muffelwild signifikant häufiger Infektionen als weibliche Tiere. Frühere Studien zur Zeckenbelastung zeigten, dass beim Rehwild männliche Tiere eine höhere Befallsrate aufwiesen. Dieser Effekt wurde der größeren Körpermasse und dem größeren Aktionsradius während des Jahres zugeschrieben (Kiffner et al., 2011; Vor et al., 2010). Da beides auch für das männliche Muffelwild zutrifft, liegt die Vermutung nahe, dass diese Begründung auch für das Muffelwild gelten könnte. Während weibliche Tiere beim Muffelwild als sehr standorttreu gelten, legen männliche Tiere zum Teil deutlich größere Strecken zurück (Piegert und Uloth, 2005). Eine erhöhte Zeckenbürde erhöht gleichzeitig die Chance sich eine zecken-übertragenes Pathogen zu zuziehen, was damit auch für *A. phagocytophilum* gelten könnte (Kiffner et al., 2011). Das Muffelwild bevorzugt trockene, sandige Böden und hält sich bevorzugt in Mittelgebirgslagen auf, das Reh dagegen bevorzugt ursprünglich Laubmischwälder und siedelt in gebüsch- und unterwuchsreichen Beständen und Waldrandzonen (Piegert und Uloth, 2005; Stubbe, 2008). *Ixodes ricinus* siedelt bevorzugt in humiden Habitaten mit einer permanent feuchten Detritusschicht, wie man sie in Laub- und Mischwäldern findet (Deplazes et al., 2012). Dieser Unterschied in der Habitatnutzung könnte erklären, warum Rehe insgesamt höhere Prävalenzen aufweisen und aufgrund des höheren Infektionsdruckes sich die Infektionsrate der Geschlechter angeglichen hat.

In der vorliegenden Studie fiel bei der Altersverteilung auf, dass Tiere aller untersuchten Spezies unter zwei Jahren signifikant häufiger Infektionen mit *A. phagocytophilum* aufwiesen als ältere Tiere. Betrachtet man die einzelnen Tierarten gilt dies weiterhin für Muffel- und Damwild, nicht jedoch für das Rehwild. Auch frühere Studien ergaben hier schon unterschiedliche Ergebnisse. In Österreich zeigten verschiedene Wildwiederkäuer unter drei Jahren eine höhere Infektionsrate als Wildwiederkäuer über drei Jahren, eine zweite Studie konnte bei der Untersuchung von Rehwild keine Unterschiede in verschiedenen

Altersklassen feststellen (Polin et al., 2004; Silaghi et al., 2011a). Das gleiche Ergebnis bezüglich Rehwild zeigte auch eine Studie aus Dänemark, die ebenfalls keine Unterschiede in der Befallsrate mit *A. phagocytophilum* je nach Alter der Tiere feststellen konnte (Skarphedinsson et al., 2005).

Die Tiere in der vorliegenden Studie wurden einmalig zum Zeitpunkt des Erlegens untersucht, so dass keine Rückschlüsse auf die Persistenz des Erregers oder den Zeitpunkt der Infektion möglich sind. Auffallend ist jedoch die sehr niedrige Anzahl von dokumentierten klinischen Fällen im Rehwild, die in starkem Kontrast zu der hohen Infektionsrate in Wildwiederkäuern stehen (Jenkins et al., 2001; Stuen et al., 2001a; Stuen et al., 2006). Aufgrund dieser Tatsache werden diese Tiere immer wieder als Haupt- bzw. Reservoirwirte für *A. phagocytophilum* vorgeschlagen (Alberdi et al., 2000; Liz et al., 2002; Stefanidesova et al., 2008) und auch die Ergebnisse dieser Studie stützen diese Theorie, wobei dem Rehwild, das signifikant häufiger infiziert war als Muffel- und Damwild, wohl eine größere Rolle zukommen könnte. Diese könnte sich auch darin begründen, dass das Reh weiter verbreitet ist und in Europa in deutlich höherer Stückzahl vorkommt, als die beiden anderen untersuchten Wildtierarten (Piegert und Uloth, 2005; Siefke und Stubbe, 2008; Stubbe, 2008). Somit unterstützt diese Studie, dass das Reh in Zentraleuropa ein Haupt- bzw. Reservoirwirt für *A. phagocytophilum* darstellt, allerdings sollte hierbei auch den verschiedenen genetischen Varianten von *A. phagocytophilum* Aufmerksamkeit geschenkt werden, da das Reh in dieser Studie häufiger Träger von Varianten war, die bisher nicht mit klinischen Erkrankungen in Verbindung gebracht wurden.

In dieser Studie wurden neun verschiedene Varianten des partiellen *16S rRNA* - Gens entdeckt.

Die Variante „B“ ist bei Menschen in Europa und den USA mit humaner granulozytärer Anaplasiose nachgewiesen worden. Allerdings wurde die Variante ebenso bei Pferden, Hunden, Wildschweinen, Igel und einigen Wildwiederkäuern nachgewiesen. Sie gilt als nicht wirtsspezifisch (Chen et al., 1994; Michalik et al., 2009; Overzier et al., 2013a; Silaghi et al., 2011b; Silaghi et al., 2011c; Silaghi et al., 2011d; Silaghi et al., 2012a; Zeman und Pecha, 2008). Im Gegensatz zu einer früheren Studie aus Deutschland wurde diese Variante hier nicht im Rehwild nachgewiesen, aber in den beiden anderen untersuchten Wildtierarten (Overzier et al., 2013a)

Variante „W“ konnte bei klinischen Fällen von Weidefieber (englisch: Tick-borne-fever) bei Wiederkäuern, wie Rinder und Schafe, in Europa nachgewiesen werden (Nieder et al., 2012; Stuen et al., 2013b). In dieser Untersuchung wurde diese Variante in Rehwild und Muffelwild gefunden. Das Muffel zeigt als ovine Spezies eine engere Verwandtschaft zu den Hauswiederkäuern als die beiden anderen cerviden Studientierarten. Bisher sind keine klinischen Krankheitsfälle nach Infektion mit *A. phagocytophilum* beim Muffelwild dokumentiert. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass das Muffelwild als ovine Spezies klinische Symptome entwickeln könnte. Das würde wiederum seine Eignung als Reservoir für diese Variante in Frage stellen. In einer Studie aus Norwegen konnte nachgewiesen werden, dass eine hohe Wilddichte zu einem Anstieg von *A. phagocytophilum*-Infektionen in wirtssuchenden Zecken führt (Rosef et al., 2009). Diese Tatsache könnte den Infektionsdruck auf Hauswiederkäuer erhöhen, die in Gegenden gehalten werden, die an Wildwiederkäuerhabitate grenzen.

Die Varianten „X“ und „Y“ sind bisher in Europa im Reh, im Muffelwild, in Elchen und in Ziegen entdeckt worden (Malmsten et al., 2014; Overzier et al., 2013a; Scharf et al., 2011; Silaghi et al., 2011a; Silaghi et al., 2012a). Beide Varianten sind bisher in keinen klinischen Fällen bei Rehwild oder Muffelwild vorgekommen, konnten aber in allen hier untersuchten Tierspezies nachgewiesen werden. Die Variante „X“ ist aber in den USA weit verbreitet. Sie entspricht im sequenzierten *16S rRNA* Genabschnitt der Variante Ap-V1 und wird mit dem Weißwedelhirsch assoziiert. Sie wurde in Amerika noch nicht mit Krankheitsfällen beim Menschen in Verbindung gebracht (Dugat et al., 2015; Massung et al., 2005).

Nur im Rehwild kamen die Varianten „I“ und „V“ vor, die auch vorher schon in dieser Spezies nachgewiesen wurde, ebenso wie in Schafen (Liz et al., 2002; Scharf et al., 2011).

Die Variante „S“ kam bisher in Rotwild, Rehwild und Steinböcken vor, ebenso in Hunden und Pferden. In dieser Studie zeigte Muffel- und Damwild diese Variante (Silaghi et al., 2011a; Silaghi et al., 2011c; Silaghi et al., 2011d).

In vorherigen Studien wurde eine Assoziation bestimmter Varianten mit bestimmten Wirten diskutiert. Man hat versucht die Varianten in „wildtier-assoziiert“, „haustier-assoziiert“ oder „beiden zugehörig“ einzuteilen (Huhn et al.,

2014; Jahfari et al., 2014; Scharf et al., 2011; Silaghi et al., 2011d). Die vorliegende Studie stützt diese Einteilung für die „Wildtier-„Varianten „X“ und „Y“. Alle anderen nachgewiesenen Varianten können hier nur als „beiden zugehörig“ eingeteilt werden. Um eine genaue Einteilung vornehmen zu können, sind jedoch weiterführende Studien sowie letztlich Infektionsversuche notwendig, um genauere Informationen über die Pathogenität einzelner Varianten für bestimmte Tierarten zu erhalten.

Beide als pathogen angenommene Varianten (B und W) konnten in der vorliegenden Studie in den untersuchten Wildwiederkäuern nachgewiesen werden. Somit liegt die Vermutung nahe, dass diese Tiere ein Teil des endemischen Zyklus dieser Varianten, die pathogen für Wiederkäuer, Haussäuger und Menschen sein können, darstellen. Auffallend ist jedoch, dass im Rehwild, trotz der insgesamt höchsten Prävalenz, nur vereinzelt die vermutlich pathogenen Varianten nachgewiesen wurden. Den größten Anteil der nachgewiesenen Varianten stellen die möglicherweise apathogenen Varianten dar. Auch in früheren Studien stellte sich schon die Frage, ob es möglicherweise apathogene „rehspezifische“ Varianten gibt (Petrovec et al., 2002; Silaghi et al., 2011b). Somit zeigen sich in dieser Untersuchung die in Deutschland weniger verbreiteten Wildwiederkäuerarten Damwild und Muffelwild möglicherweise als geeigneter als Reservoirwirte für pathogene Varianten. Ihre geschätzten Stückzahlen in Deutschland sind jedoch mit ca. 20.600 Muffeln und 130.000 Stück Damwild gegenüber ca. 4 Millionen Rehen sehr gering; des Weiteren wird Damwild zu einem großen Anteil in Gehegen gehalten (Piegert und Uloth, 2005; Siefke und Stubbe, 2008; Stubbe, 2008). So scheint das Risiko einer Übertragung pathogener Varianten für Mensch und Haussäuger geringer, als wenn das Reh überwiegend pathogene Varianten tragen würde.

2. *Babesia* spp.

Die gesamte Prävalenz von 31,0% für *Babesia* spp. ist vergleichbar mit früheren Studien bei Wildwiederkäuern in Europa. Allerdings ist ein direkter Vergleich schwierig, da abhängig von der untersuchten Wirtsspezies unterschiedliche *Babesia* spp. nachgewiesen worden. So reicht die Prävalenzspanne von 0,3% für *Babesia venatorum* bis zu 85,7% für *Babesia capreoli* (Bonnet et al., 2007; Duh et al., 2005; Michel et al., 2014; Overzier et al., 2013a; Tampieri et al., 2008).

Betrachtet man nur das Rehwild und *Babesia* spp., liegt die Prävalenz mit 62,8% höher als in den meisten vergangenen Studien, bei denen die Prävalenzraten von 12,55% in Italien bis 52,0% in Schweden reichen (Andersson et al., 2016; Zanet et al., 2014). Eine Ausnahme bildet eine Untersuchung aus Süddeutschland, die eine Befallsrate von 89,5% in einem Jagdgebiet festgestellt hat (Overzier et al., 2013a). Betrachtet man die im Reh mit 68% häufigste nachgewiesene Babesienarten *B. capreoli* zeigt sich in Europa eine Prävalenzspanne von 17,1% in der Schweiz, über 66,7% in Polen, bis zu 85,7% in Deutschland (Michel et al., 2014; Overzier et al., 2013a; Welc-Faleciak et al., 2013). Im Gegensatz dazu liegt *B. venatorum* im Reh insgesamt in Europa niedriger. Hier reicht die Prävalenzspanne von 0,3% in Italien bis 21,6% in Slowenien (Duh et al., 2005; Tampieri et al., 2008). In dieser Studie war es die zweithäufigste vorkommende *Babesia* spp. im Rehwild und zeigte eine Befallsrate von 26%.

Babesia capreoli und *B. venatorum* wurden auch im Muffelwild mit einer Gesamtprävalenz von 6,5% gefunden. Das Damwild liegt mit seiner Gesamtprävalenz mit 16,3% zwischen den beiden anderen Wirtstieren, dabei konnte aber keine der beiden Babesienarten nachgewiesen werden, die im Rehwild bzw. im Muffelwild gefunden wurden. Im Damwild kam überwiegen *B. odocoilei*-like vor.

Aufgrund der deutlich höheren Prävalenz zeigte das Reh signifikant häufiger Infektionen mit *Babesia* spp. als Muffel- und Damwild. Gründe hierfür könnten in einer langen Persistenz des Erregers liegen, die bei der sehr eng verwandten Spezies *B. divergens* mit bis zu 4 Jahren angegeben wird (Deplazes et al., 2012). Auch ein weiterer Übertragungsweg, das heißt eine transplazentare Übertragung unabhängig von der Zecke, wie er für *B. gibsoni* in Hunden beschrieben wird, wäre denkbar (Fukumoto et al., 2005).

In der vorliegenden Studie fiel auf, dass bei keiner der untersuchten Wildwiederkäuerarten eine Geschlechtsprädisposition nachgewiesen werden konnte, auch nicht bei einer Gesamtbetrachtung aller Tiere. Hier bestätigen sich Ergebnisse aus früheren Studien (Duh et al., 2005; Michel et al., 2014; Silaghi et al., 2011a; Zanet et al., 2014).

Bei Betrachtung der Altersstufen ließ sich insgesamt auch keine Prädisposition statistisch nachweisen. Dieses Ergebnis deckt sich mit früheren Studien (Duh et

al., 2005; Zanet et al., 2014). Nach Untersuchung der einzelnen Tierarten stellte sich heraus, dass das Reh mit Ansteigen der Altersklassen einen signifikanten Rückgang der Infektionen aufwies. Auch dieses Phänomen wurde schon früher nachgewiesen. Mögliche Gründe dafür sind ein Rückgang der Erregerzahl unter ein detektierbares Maß wie es in Endemiegebieten bekannt ist. Dabei zeigen die befallenen Tiere eine sog. „infektionsgebundene Immunität“; das heißt es kommt zu einem Gleichgewicht zwischen einer sehr niedrigen Parasitämie und dem Immunsystem des Wirtes. Aber auch eine Elimination des Erregers mit einer langanhaltenden nachfolgenden Immunität käme in Frage (Deplazes et al., 2012; Michel et al., 2014; Silaghi et al., 2011a).

Der Nachweis von *B. capreoli* und *B. venatorum*-DNA in Muffelwild liegt hier zum ersten Mal in Europa vor. Bisher wurden nur *B. ovis* im Serum von Muffel nachgewiesen und eine *Babesia* spp. in einem Muffel in Portugal (Ferrer et al., 1998b). Damit erweitert sich das mögliche (Reservoir-) Wirtsspektrum der beiden Babesienarten in Europa. Allerdings erscheint das Muffel im Vergleich zum Reh in dieser Studie zwar geeignet als Reservoir, aber weniger zur Verbreitung von *Babesia* spp. beizutragen, da es die gleichen Babesienarten wie das Reh beherbergt, aber in deutlich niedriger Prävalenz und seine geschätzten Stückzahlen in Deutschland und Europa mit 20.600 bzw. 117.200 weit unter denen von Rehwild mit 4 bzw. 15 Millionen liegen (Piegert und Uloth, 2005; Stubbe, 2008).

Im Damwild wurde in dieser Studie DNA von *B. odocoilei*-like gefunden, eine Variante, die schon vorher in der Schweiz gefunden wurde und eine enge Verwandtschaft zu *B. odocoilei* in Weißwedelhirschen in Nordamerika zeigt (Hilpertshauer et al., 2006). Für Deutschland ist es der erste Nachweis einer *Babesia* spp. in dieser Wildtierart. Zuvor wurde in Europa nur einmal *B. capreoli* in dieser Wildart in Österreich nachgewiesen (Rehbein et al., 2014). In dieser Studie konnte weder *B. capreoli* noch *B. venatorum* nachgewiesen werden. Da nur sehr wenige Untersuchungen zu dieser Wildwiederkäuerart vorliegen, sollten weitere epidemiologische Studien sowie möglicherweise Infektionsversuche angestrebt werden, um deren Potenzial als (Reservoir-)Wirt für Babesien genauer einzugrenzen. Bis heute ist nur ein Infektionsversuch mit *B. capreoli* bekannt (Enigk und Friedhoff, 1963). Da aber Damwild zu einem großen Anteil in Gehegen gehalten wird, wären Infektionsversuche potentiell durchführbar um

Infektionsverläufe zu reproduzieren.

3. *Theileria* spp.

Vier positive Babesien-PCR-Ergebnisse mit anschließender Sequenzierung aus Rehwild vom Standort Schlaubetal (Brandenburg) stimmten mit einer *Theileria*-Sequenz überein, die in einem Rotwild in Spanien gefunden wurde: *Theileria* 3185/02 (GenBank® accession no. AY421708). Dieses Tier wurde aus eben dieser Region in Deutschland nach Spanien importiert (Hofle et al., 2004). Ob hier ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen in Deutschland und dem Auftreten in Spanien nach dem Verbringen des Rotwildes besteht, bedarf weiterer Untersuchungen. In Spanien wurde die *Theileria* 3185/02 erneut in 28 Stück Rotwild mit einer Prävalenz von 53,6% und in 69 Stück Rehwild mit einer Prävalenz von 10,1% nachgewiesen (Garcia-Sanmartin et al., 2007). In dieser Studie wurden auch 38 Gämsen untersucht. Diese wiesen keine Infektion mit dieser Theilerie auf. Auch eine frühere Studie aus dieser geographischen Region die in einer zweigeteilten Studie 320 bzw. 80 Schafe auf Piroplasmen untersuchte, konnte diese Theilerienvariante nicht nachweisen (Nagore et al., 2004). Aufgrund einer 99,7%igen Übereinstimmung in der 18S rRNA-Sequenz mit *Theileria capreoli* isolate BAB1158 (GenBank® accession no. 726011) wurde vorgeschlagen die *Theileria* 3185/02 als *T. capreoli* zuzuordnen (Garcia-Sanmartin et al., 2007).

Ein weiterer Nachweis der *Theileria*-Variante, die in der vorliegenden Studie nachgewiesen wurde, gelang in Rotwild in Polen. Es wurden von 41 Tieren bei der Jagd Proben genommen und 88% der Tiere wiesen eine Infektion mit *Theileria* spp. auf, die als *Theileria* sp. ZS T04 benannt wurde, und nach Sequenzierung die höchste Übereinstimmung mit *Theileria* 3185/02 und *Theileria capreoli* isolate BAB1158 zeigten (Sawczuk et al., 2008).

Diese *Theileria* sp. ZS T04 wurde in einer neueren Studie in Österreich im Rotwild nachgewiesen. Hier zeigten alle 80 untersuchten Tiere eine subklinische Infektion mit diesem Erreger und wurden daher als mögliches Reservoir vorgeschlagen (Fuehrer et al., 2013).

4. Coinfektionen

Coinfektionen mit beiden untersuchten Erregerarten konnten bei 29,9% der untersuchten Tiere nachgewiesen werden. Betrachtet man nur das Rehwild liegt die Rate mit 60,8% deutlich höher als bei Muffel mit 6,5% und Damwild mit 14%. Coinfektionen sind auch früher schon in 88,4% von untersuchten Rehen in Süddeutschland gefunden worden (Overzier et al., 2013a). Auch in Österreich konnten bei Reh- und Rotwild, sowie bei Gämsen und einem Steinbock Coinfektionen mit *A. phagocytophilum* und *Babesia* spp. mit einer Prävalenz von 85,7% nachgewiesen werden (Silaghi et al., 2011a). Die Coinfektionsrate der Wildwiederkäuer aus dieser Studie lag deutlich niedriger. Das liegt vor allem an der niedrigen Coinfektionsrate von Muffelwild. Hier lag zwar bei allen Babesien-positiven Tieren auch eine Infektion mit *A. phagocytophilum* vor, aber insgesamt war nur bei 11 Tieren ein Nachweis von *Babesia* spp. positiv. Da jedoch die Tiere nur zu einem Zeitpunkt untersucht wurden, lässt sich keine Aussage darüber treffen inwiefern sich die beiden Pathogene gegenseitig beeinflussen. Ob eine bestehende *A. phagocytophilum*-Infektion eine weitere Infektion mit *Babesia* spp. begünstigt, oder umgekehrt, ist unklar. Auch ob die Infektion mit einem Erreger Einfluss auf die klinische Ausprägung des anderen Erregers hat, ist nicht nachgewiesen. Eine Studie aus Polen konnte ebenfalls unter anderem Coinfektionen von *A. phagocytophilum* und *Babesia* spp. bzw. *B. capreoli* nachweisen. Hier wird davon ausgegangen, dass Coinfektionen nicht das Infektionsrisiko für den Menschen erhöhen, da zu einem großen Anteil apathogene Spezies bzw. Varianten der Erreger beteiligt sind (Welc-Faleciak et al., 2013).

Eine Studie an fünf klinisch an Babesiose erkrankten Gämsen in der Schweiz konnte keine Coinfektion mit *A. phagocytophilum* nachweisen (Hoby et al., 2007).

Für das Rind gibt es Untersuchungen bezüglich *A. phagocytophilum* und *B. divergens*, die zeigen, dass klinische Symptome bei Coinfektionen nicht schwerer ausfallen. Das Vorkommen von *A. phagocytophilum* kann sogar die klinische Ausprägung von *B. divergens* mildern. Andererseits könne eine schwere Neutropenie aufgrund von Weidefieber die Symptome von *B. divergens* verschlimmern und die Behandlung erschweren (Purnell et al., 1977; Taylor, 1983; Zintl et al., 2003). Inwieweit diese Feststellungen auch für die untersuchten Wildtiere zutreffen ist unklar, da zum einen andere Babesienarten nachgewiesen

wurden, zum anderen zeigen Wildwiederkäuer bei Einzelinfektionen meist auch keine klinischen Symptome (Ebani et al., 2015; Malandrin et al., 2010). In dieser Studie wurde der Gesundheitszustand der Tiere von den Jagdausübungsberechtigten beurteilt. Lediglich vier Tiere wurden als abgemagert bzw. krank eingeschätzt. Dabei handelte es sich um ein Reh bei dem *B. capreoli* nachgewiesen wurde, zwei Mufflons bei denen *A. phagocytophilum* nachgewiesen wurde und ein Damwild bei dem ebenfalls *A. phagocytophilum* nachgewiesen wurde. Ob diese Erreger auch Auslöser für den schlechten Zustand der Tiere waren, wurde nicht weiter untersucht. Alle anderen Tiere wurden als gesund beurteilt. Da die untersuchten Wildtiere somit sowohl bei Einzelinfektionen als auch bei Coinfektionen meist keine Krankheitsanzeichen aufwiesen, bestätigt das wiederum ihre Eignung als Reservoirwirte.

VI. SCHLUSSFOLGERUNG

Anaplasma phagocytophilum und *Babesia* spp. waren in den untersuchten Wildwiederkäuerarten weit verbreitet. Es zeigte sich eine Gesamtprävalenz von 83,2% für den Nachweis von *A. phagocytophilum* und 31,0% für den Nachweis von *Babesia* spp. Eine Sonderrolle scheint das Rehwild einzunehmen, da es beide Erreger signifikant häufiger beherbergte. Auffallend war, dass verschiedene *A. phagocytophilum*-Varianten bzw. Babesienpezies in allen Wildwiederkäuern vorkamen. Allerdings zeigten fast alle Tiere einen guten Gesundheitszustand, so dass von subklinischen Infektionen ausgegangen werden kann. Auch die für Menschen und für andere Tierarten als pathogen eingestufteten Varianten bzw. Spezies schienen in den Wildwiederkäuern keine klinische Erkrankung auszulösen. Diese kamen in dieser Studie bei *A. phagocytophilum* nur in Muffel- und Damwild vor; für *Babesia* spp. wurde *B. venatorum* mit einer Befallsrate von 22,03% in Rehen und Mufflons und *B. odocoilei*-like Befallsrate von 4,24% in Damwild nachgewiesen. Diese Nachweise stellten jedoch im Vergleich zu den potentiell apathogenen Varianten von *A. phagocytophilum* und *B. capreoli* mit einer Prävalenz von 62,71% nur einen geringen Anteil dar. Damit scheinen sich alle drei Wildwiederkäuerarten als Reservoirwirte für *A. phagocytophilum* und bestimmte *Babesia* spp. zu eignen. Allerdings tragen sie zur Verbreitung von krankheitsauslösenden Varianten möglicherweise nur wenig bei.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Anaplasma phagocytophilum und *Babesia* spp. sind intrazelluläre durch Schildzecken übertragene Pathogene, die neutrophile Granulozyten bzw. Erythrozyten ihrer eukaryoten Wirtstiere befallen und fieberhafte Erkrankungen auslösen. Aufgrund der zunehmenden Zahl an Nachweisen bzw. Krankheitsfällen werden diese Erreger als „emerging zoonoses“ betrachtet. Das breite Wirtsspektrum beider umfasst eine Vielzahl von Säugetieren sowie den Menschen für *A. phagocytophilum* und einzelne Babesienarten wie beispielsweise *B. divergens*. Wildwiederkäuer wie beispielsweise das Reh zeigen auffallend hohe Befallsraten und werden daher als mögliche Reservoirwirte für *A. phagocytophilum* und bestimmte Babesienarten diskutiert. Da bisher keine großflächigen Untersuchungen zur Verbreitung in Wildwiederkäuern in Deutschland durchgeführt wurden, hatte diese Studie zum Ziel: 1. die Ermittlung der Prävalenz von *A. phagocytophilum* und von *Babesia* spp. in Reh-, Muffel-, und Damwildbeständen in Deutschland; 2. die Untersuchung einer *16S rRNA*-Teilnukleotidsequenz zur Ermittlung der genetischen Variabilität der vorkommenden Varianten von *A. phagocytophilum*; und 3. die Bestimmung der vorkommenden Babesienarten. Dazu wurden an 13 Standorten in Deutschland insgesamt 364 Milzproben im Rahmen der regulären Jagdstrecke von 153 Rehen, 168 Muffeln und 43 Stück Damwild entnommen und nach DNA-Extraktion im Labor mittels konventioneller bzw. real-time-PCR auf Babesien bzw. *A. phagocytophilum* untersucht. PCR-Produkte wurden sequenziert und mittels BLASTn mit der GenBank verglichen. Um mögliche Abhängigkeiten zwischen Infektion und Wirtsspezies, Wirtsalter oder -geschlecht zu untersuchen, ebenso zur Analyse von Coinfektionen, wurden der χ^2 -Test und der exakte Test nach Fisher durchgeführt. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p=0,05$ angenommen.

Es ergaben sich folgende Befallsraten für *A. phagocytophilum*: 83,2% (303/364) aller untersuchten Tiere waren befallen; im einzelnen Rehwild 96,1% (147/153), Muffelwild 74,4% (125/168) und Damwild 72,1% (31/43). Rehwild zeigte signifikant häufiger Infektionen mit *A. phagocytophilum* als Muffelwild und Damwild ($p<0,0001$). Männliches Muffelwild war signifikant häufiger infiziert als weibliche Tiere ($p=0,0484$). Tiere unter zwei Jahren zeigten signifikant häufiger Infektionen ($p<0,0001$), nur bei Einzelbetrachtung des Rehwildes zeigte sich kein

Unterschied der Befallsraten in den verschiedenen Alterskategorien. Die Sequenzierung der *A. phagocytophilum*-positiven Proben ergab neun verschiedene Varianten im partiellen *16S rRNA*-Gen. Es wurden die bekannten Varianten „B“, „I“, „S“, „V“, „W“, „X“ und „Y“; sowie zwei bisher unbekannte Varianten sequenziert. Das Vorkommen mehrerer unterschiedlicher Varianten in allen drei Wirtstierarten im *16S rRNA*-Gen legt nahe, dass die untersuchten Wirtstiere Träger unterschiedlicher Varianten sind, die auch in ihrer Pathogenität Unterschiede aufweisen könnten. Es ergaben sich folgende Befallsraten für *Babesia* spp.: 31,0% (113/364) aller untersuchten Tiere waren befallen; im einzelnen Rehwild 62,8% (96/153), Muffelwild 6,5% (11/168) und Damwild 16,3% (6/43). Auch hier war das Reh signifikant häufiger mit *Babesia* spp. infiziert, als die beiden anderen Wildwiederkäuerarten ($p < 0,0001$). Eine Geschlechtsprädisposition konnte für keine Tierart nachgewiesen werden. Insgesamt gab es auch keine Unterschiede in den Befallsraten der unterschiedlichen Altersklassen. Bei Betrachtung der Einzeltierarten zeigte das Reh einen signifikanten Rückgang der Infektionen je höher die Altersklasse war ($p = 0,0418$). Die Sequenzierung zur Speziesbestimmung zeigte das Vorkommen von *B. capreoli* ($n = 74$) und *B. venatorum* ($n = 26$) bei Rehwild und Muffelwild, sowie *B. odocoilei*-like ($n = 5$) in Damwild. Zusätzlich zeigte sich bei vier Rehen als Sequenzierungsergebnis der *Babesia*-PCR eine Übereinstimmung mit *Theileria* sp. 3185/02. Coinfektionen wurden bei insgesamt 29,9% (109/364) der Tiere festgestellt. 54,4% (98/364) aller Tiere zeigten Einzelinfektionen, davon 53,3% ein positives Ergebnis für *A. phagocytophilum* und 1,1% für *Babesia* spp.. Ein negatives Ergebnis für beide Erreger zeigten 15,7% der Wildwiederkäuer. Eine Coinfektion wurde bei 60,8% des Rehwildes, 6,5% des Muffelwildes und 14,0% des Damwildes festgestellt. Rehwild war signifikant häufiger coinfiziert als Muffel- und Damwild ($p < 0,0001$). Im Muffelwild gelang der erste Nachweis von *B. capreoli* und *B. venatorum* in Europa. Im Damwild wurde erstmals *Babesia* spp. in Deutschland nachgewiesen. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Wildwiederkäuer und vor allem das Reh mögliche Reservoirwirte für *A. phagocytophilum* und bestimmte Babesienarten darstellen.

VIII. SUMMARY

Anaplasma phagocytophilum and *Babesia* spp. are intracellular pathogens which are transmitted by ixodid ticks, and which attack neutrophil granulocytes or erythrocytes of their eukaryotic host animals and trigger febrile diseases. Due to an increasing numbers of detections and case reports, these pathogens are regarded as "emerging zoonoses". The broad range of hosts of both of them includes a variety of mammals as well as humans for *A. phagocytophilum* and some *Babesia* spp. such as *B. divergens*. Wild ruminants such as roe deer show strikingly high prevalence rates and are therefore discussed as potential reservoirs for *A. phagocytophilum* and certain species of *Babesia*. Since no large-scale studies on the distribution in wild ruminants in Germany were carried out so far, the aims of this study were to: 1. determine the prevalence of *A. phagocytophilum* and *Babesia* spp. in roe deer, mouflon and fallow deer stands in Germany; 2. the investigation of a *16S rRNA* partial nucleotide sequence for the determination of the genetic variability of the occurring variants of *A. phagocytophilum*; and (3) the determination of the occurring *Babesia* species. For this purpose, a total of 364 spleen samples were collected at 13 locations in Germany in the course of the regular hunting season of 153 roe deer, 168 mouflons and 43 fallow deer and after DNA-extraction in the laboratory, they were examined by conventional or real-time PCR for the occurrence of *Babesia* spp. and *A. phagocytophilum*. PCR products were sequenced and compared to GenBank by BLASTn. In order to investigate possible dependencies between infection and host species, host age and sex, as well as for the analysis of co-infections, the χ^2 test and the exact test were carried out according to Fisher. A significance level of $p = 0.05$ was assumed.

The following incidence rates for *A. phagocytophilum* were obtained: 83.2% (303/364) of all examined animals were infected; in particular roe deer, 96.1% (147/153), mouflons 74.4% (125/168) and fallow deer 72.1% (31/43). Roe deer showed significantly more frequently infections with *A. phagocytophilum* as mouflons and fallow deer ($p < 0.0001$). Male mouflons were significantly more frequently infected than females ($p = 0.0484$). Animals under two years were significantly more often infected ($p < 0.0001$), but no differences in the infection rates of the various age categories were found looking only at roe deer.

Sequencing of the *A. phagocytophilum* positive samples revealed nine different variants in the partial *16S rRNA* gene. The known variants "B", "I", "S", "V", "W", "X" and "Y"; As well as two unknown variants. The presence of several different variants in all three host species in the *16S rRNA* gene suggests that the investigated host animals are carriers of different variants, which may also differ in their pathogenicity. The following infestation rates for *Babesia* spp. were found: 31.0% (113/364) of all examined animals were infected; with roe deer 62.8% (96/153), mouflons 6.5% (11/168) and fallow deer 16.3% (6/43). Again, roe deer was significantly more often infected with *Babesia* spp. ($P < 0.0001$) than the other two wild ruminant species. No gender predisposition could be demonstrated for any species. Overall, there were also no differences in the infection rates of different age groups. When looking at the single deer species, roe deer showed a significantly lower infection rate at the higher age class ($p = 0.0418$). The sequencing for species determination showed the occurrence of *B. capreoli* ($n = 74$) and *B. venatorum* ($n = 26$) in roe deer and mouflons, as well as *B. odocoilei*-like ($n = 5$) in fallow deer. In addition, sequence of *Babesia* PCR product from four roe deer revealed greatest similarity to *Theileria* sp. 3185/02. Co-infection with both pathogens was detected in total of 29.9% (109/364) of the animals. 54.4% (98/364) of all animals showed single infections, of which 53.3% showed a positive result for *A. phagocytophilum* and 1.1% for *Babesia* spp. A negative result for both pathogens showed 15.7% of wild ruminants. Co-infection was found in 60.8% of deer, 6.5% of the mouflons and 14.0% of the fallow deer. Roe deer was significantly more frequently coinfecting than mouflons and fallow deer ($p < 0.0001$) The first detection of *B. capreoli* and *B. venatorum* in mouflon in Europe was shown. In fallow deer, it is the first detection of *Babesia* spp. in Germany. The results support the hypothesis that wild ruminants and especially roe deer represent possible reservoirs for *A. phagocytophilum* and certain *Babesia* spp.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

Adamska, M., Skotarczak, B., 2007. Wild game as a reservoir of *Anaplasma phagocytophilum* in north-western Poland. *Wiad Parazytol* 53, 103-107.

Adaszek, L., Klimiuk, P., Skrzypczak, M., Gorna, M., Zietek, J., Winiarczyk, S., 2012. The identification of *Anaplasma* spp. isolated from fallow deer (*Dama dama*) on a free-range farm in eastern Poland. *Polish journal of veterinary sciences* 15, 393-394.

Akel, T., Mobarakai, N., 2017. Hematologic manifestations of babesiosis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 16, 6.

Aktas, M., Ozubek, S., 2015. Bovine anaplasmosis in Turkey: First laboratory confirmed clinical cases caused by *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary microbiology* 178, 246-251.

Alberdi, M.P., Walker, A.R., Paxton, E.A., Sumption, K.J., 1998. Natural prevalence of infection with *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila* of *Ixodes ricinus* ticks in Scotland. *Vet Parasitol* 78, 203-213.

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

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

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

Andersson, M.O., Bergvall, U.A., Chirico, J., Christensson, M., Lindgren, P.E., Nordstrom, J., Kjellander, P., 2016. Molecular detection of *Babesia capreoli* and *Babesia venatorum* in wild Swedish roe deer, *Capreolus capreolus*. Parasit Vectors 9, 221.

Bakken, J.S., Dumler, J.S., 2015. Human granulocytic anaplasmosis. Infectious disease clinics of North America 29, 341-355.

Bakken, J.S., Dumler, J.S., Chen, S.M., Eckman, M.R., Van Etta, L.L., Walker, D.H., 1994. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? Jama 272, 212-218.

Bakken, J.S., Dumler, S., 2008. Human granulocytic anaplasmosis. Infectious disease clinics of North America 22, 433-448, viii.

Baldrige, G.D., Scoles, G.A., Burkhardt, N.Y., Schloeder, B., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., 2009. Transovarial transmission of *Francisella*-like endosymbionts and *Anaplasma phagocytophilum* variants in *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae). Journal of medical entomology 46, 625-632.

Barlough, J.E., Madigan, J.E., Kramer, V.L., Clover, J.R., Hui, L.T., Webb, J.P., Vredevoe, L.K., 1997. *Ehrlichia phagocytophila* genogroup rickettsiae in ixodid ticks from California collected in 1995 and 1996. J Clin Microbiol 35, 2018-2021.

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

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

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

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

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

Bown, K.J., Lambin, X., Telford, G., Heyder-Bruckner, D., Ogden, N.H., Birtles, R.J., 2011. The common shrew (*Sorex araneus*): a neglected host of tick-borne infections? *Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 947-953.

Cao, W.C., Zhao, Q.M., Zhang, P.H., Dumler, J.S., Zhang, X.T., Fang, L.Q., Yang, H., 2000. Granulocytic Ehrlichiae in *Ixodes persulcatus* ticks from an area in China where Lyme disease is endemic. *J Clin Microbiol* 38, 4208-4210.

Carrade, D.D., Foley, J.E., Borjesson, D.L., Sykes, J.E., 2009. Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *Journal of veterinary internal medicine* 23, 1129-1141.

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.

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.

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

Corrain, R., Drigo, M., Fenati, M., Menandro, M.L., Mondin, A., Pasotto, D., Martini, M., 2012. Study on ticks and tick-borne zoonoses in public parks in Italy. *Zoonoses and public health* 59, 468-476.

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

Courtney, J.W., Dryden, R.L., Montgomery, J., Schneider, B.S., Smith, G., Massung, R.F., 2003. Molecular characterization of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes scapularis* ticks from Pennsylvania. *J Clin Microbiol* 41, 1569-1573.

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., Ruiz-Fons, F., Naranjo, V., Torina, A., Rodriguez, O., Gortazar, C., 2008. Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. *Res Vet Sci* 84, 382-386.

Deplazes, P., Eckert, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Zahner, H. 2012. *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin* (Stuttgart, Enke Verlag).

Di Domenico, M., Pascucci, I., Curini, V., Cocco, A., Dall'Acqua, F., Pompili, C., Camma, C., 2016. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* genotypes that are potentially virulent for human in wild ruminants and *Ixodes ricinus* in Central Italy. *Ticks Tick Borne Dis* 7, 782-787.

Dondi, F., Russo, S., Agnoli, C., Mengoli, N., Balboni, A., Alberti, A., Battilani, M., 2014. Clinicopathological and molecular findings in a case of canine *Anaplasma phagocytophilum* infection in Northern Italy. *TheScientificWorldJournal* 2014, 810587.

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.

Dugat, T., Lagree, A.C., Maillard, R., Boulouis, H.J., Haddad, N., 2015. Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 5, 61.

Dugat, T., Zanella, G., Veran, L., Lesage, C., Girault, G., Durand, B., Lagree, A.C., Boulouis, H.J., Haddad, N., 2016. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis potentially reveals the existence of two groups of *Anaplasma phagocytophilum* circulating in cattle in France with different wild reservoirs. *Parasit Vectors* 9, 596.

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

Dumler, J.S., 2012. The biological basis of severe outcomes in *Anaplasma phagocytophilum* infection. *FEMS immunology and medical microbiology* 64, 13-20.

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.

Ebani, V.V., Bertelloni, F., Turchi, B., Filogari, D., Cerri, D., 2015. Molecular survey of tick-borne pathogens in Ixodid ticks collected from hunted wild animals in Tuscany, Italy. *Asian Pacific journal of tropical medicine* 8, 714-717.

Ebani, V.V., Cerri, D., Fratini, F., Ampola, M., Andreani, E., 2007. *Anaplasma phagocytophilum* infection in a fallow deer (*Dama dama*) population in a preserve of central Italy. *New Microbiol* 30, 161-165.

Engvall, E.O., Egenvall, A., 2002. Granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses. *Int J Med Microbiol* 291 Suppl 33, 100-103.

Enigk, K., Friedhoff, K., 1962a. *Babesia capreoli* in the roe deer (*Capreolus capreolus*) English summ. *Zeit Tropenmed U Parasitol* 13, 8-20.

Enigk, K., Friedhoff, K., 1962b. On the host specificity of *Babesia divergens* (*Piroplasmidea*) English summ. *Zeit Parasitenk* 21, 238-256, 231-214.

Enigk, K., Friedhoff, K., 1963. On the susceptibility of the red and fallow deer to *Babesia capreoli* (*Piroplasmidea*) English summ. *Zeit Tropenmed U Parasitol* 14, 57-62.

Eshoo, M.W., Crowder, C.D., Carolan, H.E., Rounds, M.A., Ecker, D.J., Haag, H., Mothes, B., Nolte, O., 2014. Broad-range survey of tick-borne pathogens in Southern Germany reveals a high prevalence of *Babesia microti* and a diversity of other tick-borne pathogens. *Vector Borne Zoonotic Dis* 14, 584-591.

Ferrer, D., Castella, J., Gutierrez, J.F., Lavin, S., Marco, I., 1998a. Seroprevalence of *Babesia ovis* in mouflon sheep in Spain. *J Wildl Dis* 34, 637-639.

Ferrer, D., Castella, J., Gutierrez, J.F., Lavin, S., Marco, I., 1998b. Seroprevalence of *Babesia ovis* in Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) in Catalonia, northeastern Spain. *Vet Parasitol* 75, 93-98.

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. *Journal of medical entomology* 48, 441-444.

Fuehrer, H.P., Biro, N., Harl, J., Worliczek, H.L., Beiglbock, C., Farkas, R., Joachim, A., Duscher, G.G., 2013. Molecular detection of *Theileria* sp. ZS TO4 in red deer (*Cervus elaphus*) and questing *Haemaphysalis concinna* ticks in Eastern Austria. *Vet Parasitol* 197, 653-657.

Fukumoto, S., Suzuki, H., Igarashi, I., Xuan, X., 2005. Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Int J Parasitol* 35, 1031-1035.

Garcia-Sanmartin, J., Aurtenetxe, O., Barral, M., Marco, I., Lavin, S., Garcia-Perez, A.L., Hurtado, A., 2007. Molecular detection and characterization of piroplasms infecting cervids and chamois in Northern Spain. *Parasitology* 134, 391-398.

Granquist, E.G., Kristiansson, M., Lindgren, P.E., Matussek, A., Nodtvedt, A., Okstad, W., Stuen, S., 2014. Evaluation of microbial communities and symbionts in *Ixodes ricinus* and ungulate hosts (*Cervus elaphus* and *Ovis aries*) from shared habitats on the west coast of Norway. *Ticks Tick Borne Dis* 5, 780-784.

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

Gribble, D.H., 1969. Equine ehrlichiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 155, 462-469.

Hapunik, J., Vichova, 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, 73-77.

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

Haselbarth, K., Tenter, A.M., Brade, V., Krieger, G., Hunfeld, K.P., 2007. First case of human babesiosis in Germany - Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. *Int J Med Microbiol* 297, 197-204.

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

Hildebrandt, A., Fritsch, J., Franke, J., Sachse, S., Dorn, W., Straube, E., 2011. Co-circulation of emerging tick-borne pathogens in Middle Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 533-537.

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.

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

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

Hoby, S., Robert, N., Mathis, A., Schmid, N., Meli, M.L., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H., Deplazes, P., Ryser-Degiorgis, M.P., 2007. Babesiosis in free-ranging chamois (*Rupicapra r. rupicapra*) from Switzerland. *Vet Parasitol* 148, 341-345.

Hofle, U., Vicente, J., Nagore, D., Hurtado, A., Pena, A., de la Fuente, J., Gortazar, C., 2004. The risks of translocating wildlife. Pathogenic infection with *Theileria* sp. and *Elaeophora elaphi* in an imported red deer. *Vet Parasitol* 126, 387-395.

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

Huhn, C., Winter, C., Wolfsperger, T., Wuppenhorst, N., Strasek Smrdel, K., Skuballa, J., Pfaffle, M., Petney, T., Silaghi, C., Dyachenko, V., Pantchev, N., Straubinger, R.K., Schaarschmidt-Kiener, D., Ganter, M., Aardema, M.L., von Loewenich, F.D., 2014. Analysis of the population structure of *Anaplasma phagocytophilum* using multilocus sequence typing. *PLoS One* 9, e93725.

Hulinska, D., Langrova, K., Pejcoch, M., Pavlasek, 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.

Jahfari, S., Coipan, E.C., Fonville, M., van Leeuwen, A.D., Hengeveld, P., Heylen, D., Heyman, P., van Maanen, C., Butler, C.M., Foldvari, G., Szekeres, S., van Duijvendijk, G., Tack, W., Rijks, J.M., van der Giessen, J., Takken, W., van Wieren, S.E., Takumi, K., Sprong, H., 2014. Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. *Parasit Vectors* 7, 365.

Jenkins, A., Handeland, K., Stuen, S., Schouls, L., van de Pol, I., Meen, R.T., Kristiansen, B.E., 2001. Ehrlichiosis in a moose calf in Norway. *J Wildl Dis* 37, 201-203.

Jonasson, J., Olofsson, M., Monstein, H.J., 2007. Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of *16s rDNA* fragments. 2002. *APMIS* 115, 668-677; discussion 678-669.

Juste, R.A., Scott, G.R., Paxton, E.A., Gelabert, J.L., Jimenez, S., 1989. Presence of *Cytoecetes phagocytophila* in an atypical disease of cattle in Spain. *Vet Rec* 124, 636.

Karbowiak, G., Vichova, B., Werszko, J., Demiaszkiewicz, A.W., Pyziel, A.M., Sytykiewicz, H., Szewczyk, T., Petko, B., 2015. The infection of reintroduced ruminants - *Bison bonasus* and *Alces alces* - with *Anaplasma phagocytophilum* in northern Poland. *Acta Parasitol* 60, 645-648.

Kiffner, C., Lodige, C., Alings, M., Vor, T., Ruhe, F., 2011. Body-mass or sex-biased tick parasitism in roe deer (*Capreolus capreolus*)? A GAMLSS approach. *Med Vet Entomol* 25, 39-45.

Kohn, B., Galke, D., Beelitz, P., Pfister, K., 2008. Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *Journal of veterinary internal medicine* 22, 1289-1295.

Lane, R.S., Foley, J.E., Eisen, L., Lennette, E.T., Peot, M.A., 2001. Acarologic risk of exposure to emerging tick-borne bacterial pathogens in a semirural community in northern California. *Vector Borne Zoonotic Dis* 1, 197-210.

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

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.

Liz, J.S., Sumner, J.W., Pfister, K., Brossard, M., 2002. PCR detection and serological evidence of granulocytic ehrlichial infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*). *J Clin Microbiol* 40, 892-897.

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

Magnarelli, L.A., Stafford, K.C., 3rd, Mather, T.N., Yeh, M.T., Horn, K.D., Dumler, J.S., 1995. Hemocytic *rickettsia*-like organisms in ticks: serologic reactivity with antisera to Ehrlichiae and detection of DNA of agent of human granulocytic ehrlichiosis by PCR. *J Clin Microbiol* 33, 2710-2714.

Malandrin, L., Jouglin, M., Sun, Y., Brisseau, N., Chauvin, A., 2010. Redescription of *Babesia capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962) from roe deer (*Capreolus capreolus*): isolation, cultivation, host specificity, molecular characterisation and differentiation from *Babesia divergens*. *Int J Parasitol* 40, 277-284.

Malmsten, J., Widen, D.G., Rydevik, G., Yon, L., Hutchings, M.R., Thulin, C.G., Soderquist, L., Aspan, A., Stuen, S., Dalin, A.M., 2014. Temporal and spatial variation in *Anaplasma phagocytophilum* infection in Swedish moose (*Alces alces*). *Epidemiol Infect* 142, 1205-1213.

Massung, R.F., Courtney, J.W., Hiratzka, S.L., Pitzer, V.E., Smith, G., Dryden, R.L., 2005. *Anaplasma phagocytophilum* in white-tailed deer. *Emerg Infect Dis* 11, 1604-1606.

Massung, R.F., Mauel, M.J., Owens, J.H., Allan, N., Courtney, J.W., Stafford, K.C., 3rd, Mather, T.N., 2002. Genetic variants of *Ehrlichia phagocytophila*, Rhode Island and Connecticut. *Emerg Infect Dis* 8, 467-472.

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. *The Journal of infectious diseases* 188, 1757-1763.

Michalik, J., Stanczak, J., Racewicz, M., Cieniuch, S., Sikora, B., Szubert-Kruszynska, 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 Suppl 2, 81-83.

Michalski, M., Rosenfield, C., Erickson, M., Selle, R., Bates, K., Essar, D., Massung, R., 2006. *Anaplasma phagocytophilum* in central and western Wisconsin: a molecular survey. *Parasitol Res* 99, 694-699.

Michel, A.O., Mathis, A., Ryser-Degiorgis, M.P., 2014. *Babesia* spp. in European wild ruminant species: parasite diversity and risk factors for infection. *Vet Res* 45, 65.

Milutinovic, M., Masuzawa, T., Tomanovic, S., Radulovic, 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.

Moreno, C.X., Moy, F., Daniels, T.J., Godfrey, H.P., Cabello, F.C., 2006. Molecular analysis of microbial communities identified in different developmental stages of *Ixodes scapularis* ticks from Westchester and Dutchess Counties, New York. *Environmental microbiology* 8, 761-772.

Nagore, D., Garcia-Sanmartin, J., Garcia-Perez, A.L., Juste, R.A., Hurtado, A., 2004. Identification, genetic diversity and prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in a sheep population from Northern Spain. *Int J Parasitol* 34, 1059-1067.

Nieder, M., Silaghi, C., Hamel, D., Pfister, K., Schmaschke, 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.

Nilsson, O., Nordkvist, M., Ryden, L., 1965. Experimental *Babesia divergens* infection in reindeer (*Rangifer tarandus*). *Acta Veterinaria Scand* 8, 353-359.

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* 7, 563.

Ogden, N.H., Woldehiwet, Z., Hart, C.A., 1998. Granulocytic ehrlichiosis: an emerging or rediscovered tick-borne disease? *J Med Microbiol* 47, 475-482.

Oporto, B., Gil, H., Barral, M., Hurtado, A., Juste, R.A., Garcia-Perez, A.L., 2003. A survey on *Anaplasma phagocytophila* in wild small mammals and roe deer (*Capreolus capreolus*) in Northern Spain. *Ann N Y Acad Sci* 990, 98-102.

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

Overzier, E., Pfister, K., Thiel, C., Herb, I., Mahling, M., Silaghi, C., 2013b. 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.

Palomar, A.M., Garcia-Alvarez, L., Santibanez, S., Portillo, A., Oteo, J.A., 2014. Detection of tick-borne '*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*' and *Anaplasma phagocytophilum* in Spain in 2013. *Parasit Vectors* 7, 57.

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

Paulauskas, A., Radzijeuskaja, J., Rosef, O., 2012. Molecular detection and characterization of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 35, 187-195.

Pereira, A., Parreira, R., Nunes, M., Casadinho, A., Vieira, M.L., Campino, L., Maia, C., 2016. Molecular detection of tick-borne bacteria and protozoa in cervids and wild boars from Portugal. *Parasit Vectors* 9, 251.

Petrovec, M., Bidovec, A., Sumner, J.W., Nicholson, W.L., Childs, J.E., Avsic-Zupanc, T., 2002. Infection with *Anaplasma phagocytophila* in cervids from Slovenia: evidence of two genotypic lineages. *Wien Klin Wochenschr* 114, 641-647.

Petrovec, M., Sixl, W., Schweiger, R., Mikulasek, S., Elke, L., Wust, G., Marth, E., Strasek, K., Stunzner, 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.

Pfister, K., Roesti, A., Boss, P.H., Balsiger, B., 1987. [*Ehrlichia phagocytophila* as the agent of grazing fever in the Berne highlands]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 129, 343-347.

Piegert, H., Uloth, W. 2005. *Der Europäische Mufflon* (Hamburg, DSV-Verlag GmbH).

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

Purnell, R.E., Young, E.R., Brocklesby, D.W., Hendry, D.J., 1977. The haematology of experimentally-induced *B divergens* and *E phagocytophila* infections in splenectomised calves. Vet Rec 100, 4-6.

Pusterla, N., Braun, U., 1997. Clinical findings in cows after experimental infection with *Ehrlichia phagocytophila*. Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe A 44, 385-390.

Pusterla, N., Huder, J., Wolfensberger, C., Braun, U., Lutz, H., 1997. Laboratory findings in cows after experimental infection with *Ehrlichia phagocytophila*. Clin Diagn Lab Immunol 4, 643-647.

Rehbein, S., Visser, M., Jekel, I., Silaghi, C., 2014. Endoparasites of the fallow deer (*Dama dama*) of the Antheringer Au in Salzburg, Austria. Wien Klin Wochenschr 126 Suppl 1, S37-41.

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

Robinson, M.T., Shaw, S.E., Morgan, E.R., 2009. *Anaplasma phagocytophilum* infection in a multi-species deer community in the New Forest, England. European Journal of Wildlife Research 55, 439-442.

Rosef, O., Paulauskas, A., Radzijeuskaja, J., 2009. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks in relation to the density of wild cervids. Acta veterinaria Scandinavica 51, 47.

Rozej-Bielicka, W., Stypulkowska-Misiurewicz, H., Golab, E., 2015. Human babesiosis. *Przegląd epidemiologiczny* 69, 489-494, 605-488.

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

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

Sawczuk, M., Maciejewska, A., Adamska, M., Skotarczak, B., 2005. [Roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) as a reservoir of protozoans from *Babesia* and *Theileria* genus in north-western Poland]. *Wiad Parazytol* 51, 243-247.

Sawczuk, M., Maciejewska, A., Skotarczak, B., 2008. Identification and molecular characterization of *Theileria* sp infecting red deer (*Cervus elaphus*) in northwestern Poland. *European Journal of Wildlife Research* 54, 225-230.

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

Schauer, S.M., 2008. Genetische Charakterisierung von *Anaplasma phagocytophilum* Stämmen in Europa. Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br.

Schmid, N., Deplazes, P., Hoby, S., Ryser-Degiorgis, M.P., Edelhofer, R., Mathis, A., 2008. *Babesia divergens*-like organisms from free-ranging chamois (*Rupicapra r. rupicapra*) and roe deer (*Capreolus c. capreolus*) are distinct from *B. divergens* of cattle origin - an epidemiological and molecular genetic investigation. *Vet Parasitol* 154, 14-20.

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.

Severo, M.S., Stephens, K.D., Kotsyfakis, M., Pedra, J.H., 2012. *Anaplasma phagocytophilum*: deceptively simple or simply deceptive? *Future Microbiology* 7, 719-731.

Siefke, A., Stubbe, C. 2008. Das Damwild (Melsungen, Verlag J. Neumann-Neudamm AG).

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. Tierarz. Monats.* 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., Kohn, B., Chirek, A., Thiel, C., Nolte, I., Liebisch, G., Pfister, K., 2011c. Relationship of molecular and clinical findings on *Anaplasma phagocytophilum* involved in natural infections of dogs. *J Clin Microbiol* 49, 4413-4414.

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

Silaghi, C., Pfister, K., Overzier, E., 2014. Molecular investigation for bacterial and protozoan tick-borne pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) from southern Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis* 14, 371-373.

Silaghi, C., Skuballa, J., Thiel, C., Pfister, K., Petney, T., Pfaffle, 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.

Skarphedinsson, S., Jensen, P.M., Kristiansen, K., 2005. Survey of tickborne infections in Denmark. *Emerg Infect Dis* 11, 1055-1061.

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

Stubbe, C. 2008. *Rehwild -Biologie, Ökologie, Hege und Jagd* (Stuttgart, Franckh-Kosmos-Verlag).

Stuen, S., 1996. Experimental tick-borne fever infection in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Vet Rec* 138, 595-596.

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

Stuen, S., Akerstedt, J., Bergstrom, K., Handeland, K., 2002. Antibodies to granulocytic *Ehrlichia* in moose, red deer, and roe deer in Norway. *J Wildl Dis* 38, 1-6.

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

Stuen, S., Engvall, E.O., van de Poll, I., Schouls, L.M., 2001a. Granulocytic ehrlichiosis in a roe deer calf in Norway. *J Wildl Dis* 37, 614-616.

Stuen, S., Granquist, E.G., Silaghi, C., 2013a. *Anaplasma phagocytophilum*--a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 3, 31.

Stuen, S., Handeland, K., Frammarsvik, T., Bergstrom, K., 2001b. Experimental *Ehrlichia phagocytophila* infection in red deer (*Cervus elaphus*). *Vet Rec* 149, 390-392.

Stuen, S., Moum, T., Bernhoft, A., Vene, S., 2006. A paretic condition in an *Anaplasma phagocytophilum* infected roe deer calf. *J Wildl Dis* 42, 170-174.

Stuen, S., Pettersen, K.S., Granquist, E.G., Bergstrom, K., Bown, K.J., Birtles, R.J., 2013b. *Anaplasma phagocytophilum* variants in sympatric red deer (*Cervus elaphus*) and sheep in southern Norway. *Ticks Tick Borne Dis* 4, 197-201.

Suss, J., Fingerle, V., Hunfeld, K.P., Schrader, C., Wilske, B., 2004. [Tick-borne human pathogenic microorganisms found in Europe and those considered nonpathogenic. Part II: Bacteria, parasites and mixed infections]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 47, 470-486.

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

Tate, C.M., Mead, D.G., Luttrell, M.P., Howerth, E.W., Dugan, V.G., Munderloh, U.G., Davidson, W.R., 2005. Experimental infection of white-tailed deer with *Anaplasma phagocytophilum*, etiologic agent of human granulocytic anaplasmosis. *J Clin Microbiol* 43, 3595-3601.

Taylor, S.M., 1983. Assessment of prevalence of clinical babesiosis in cattle in Northern Ireland. *Vet Rec* 112, 247-250.

Tomanovic, S., Chochlakis, D., Radulovic, Z., Milutinovic, M., Cakic, S., Mihaljica, D., Tselentis, Y., Psaroulaki, A., 2013. Analysis of pathogen co-occurrence in host-seeking adult hard ticks from Serbia. *Exp Appl Acarol* 59, 367-376.

Torina, A., Alongi, A., Naranjo, V., Scimeca, S., Nicosia, S., Di Marco, V., Caracappa, S., Kocan, K.M., de la Fuente, J., 2008. Characterization of *anaplasma* infections in Sicily, Italy. *Ann N Y Acad Sci* 1149, 90-93.

Tuomi, J., 1967. Experimental studies on bovine tick-borne fever. 1. Clinical and haematological data, some properties of the causative agent, and homologous immunity. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* 70, 429-445.

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

Vannier, E., Krause, P.J., 2009. Update on babesiosis. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases* 2009, 984568.

Veronesi, F., Galuppi, R., Tampieri, M.P., Bonoli, C., Mammoli, R., Fioretti, D.P., 2010. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in fallow deer (*Dama dama*) and feeding ticks from an Italy preserve. *Res Vet Sci*.

Vichova, B., Majlathova, V., Novakova, M., Straka, M., Pet'ko, B., 2010. First molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in European brown bear (*Ursus arctos*). Vector Borne Zoonotic Dis 10, 543-545.

Vor, T., Kiffner, C., Hagedorn, P., Niedrig, M., Ruhe, F., 2010. Tick burden on European roe deer (*Capreolus capreolus*). Exp Appl Acarol 51, 405-417.

Walk, S.T., Xu, G., Stull, J.W., Rich, S.M., 2009. Correlation between tick density and pathogen endemicity, New Hampshire. Emerg Infect Dis 15, 585-587.

Walker, A.R., Alberdi, M.P., Urquhart, K.A., Rose, H., 2001. Risk factors in habitats of the tick *Ixodes ricinus* influencing human exposure to *Ehrlichia phagocytophila* bacteria. Med Vet Entomol 15, 40-49.

Wang, Y., Qian, P.Y., 2009. Conservative fragments in bacterial *16S rRNA* genes and primer design for *16S ribosomal DNA* amplicons in metagenomic studies. PLoS One 4, e7401.

Welc-Faleciak, R., Pawelczyk, A., Radkowski, M., Pancewicz, S.A., Zajkowska, J., Sinski, E., 2015. First report of two asymptomatic cases of human infection with *Babesia microti* (Franca, 1910) in Poland. Ann Agric Environ Med 22, 51-54.

Welc-Faleciak, R., Werszko, J., Cydzik, K., Bajer, A., Michalik, J., Behnke, J.M., 2013. Co-infection and genetic diversity of tick-borne pathogens in roe deer from Poland. Vector Borne Zoonotic Dis 13, 277-288.

Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. Microbiological reviews 51, 221-271.

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

Ybanez, A.P., Matsumoto, K., Kishimoto, T., Yokoyama, N., Inokuma, H., 2012. Dual presence of *Anaplasma phagocytophilum* and its closely related *Anaplasma* sp. in ixodid ticks in Hokkaido, Japan, and their specific molecular detection. *The Journal of veterinary medical science* 74, 1551-1560.

Zanet, S., Trisciuglio, A., Bottero, E., de Mera, I.G., Gortazar, C., Carpignano, M.G., Ferroglio, E., 2014. Piroplasmosis in wildlife: *Babesia* and *Theileria* affecting free-ranging ungulates and carnivores in the Italian Alps. *Parasit Vectors* 7, 70.

Zeman, P., Pecha, M., 2008. Segregation of genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* circulating among wild ruminants within a Bohemian forest (Czech Republic). *International Journal of Medical Microbiology* 298, 203-210.

Zhang, L., Shan, A., Mathew, B., Yin, J., Fu, X., Zhang, J., Lu, J., Xu, J., Dumler, J.S., 2008. Rickettsial Seroepidemiology among farm workers, Tianjin, People's Republic of China. *Emerg Infect Dis* 14, 938-940.

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.

X. ANHANG

1. Abbildungen

Abbildung 1: Taxonomische Einordnung von *Anaplasma phagocytophilum* nach (Dumler et al., 2001)

Abbildung 2: Taxonomische Einordnung der Babesien nach (Gray et al., 2010; Homer et al., 2000)

2. Tabellen

Tabelle 1: Mittels PCR nachgewiesene Prävalenzintervalle von *Anaplasma phagocytophilum* in den häufigsten Zeckenarten (Auswahl)

Tabelle 2: Mittels PCR nachgewiesene Prävalenzraten von *Anaplasma phagocytophilum* in den in dieser Studie untersuchten Wildwiederkäuerspezies

Tabelle 3: Mittels PCR nachgewiesene Prävalenzraten von *Babesia* spp. in wirtssuchenden *Ixodes ricinus* in Deutschland (Auswahl)

Tabelle 4: Mittels PCR nachgewiesene Prävalenzraten von *Babesia* spp. in Rehwild

Tabelle 5: Herkunftsdaten der Wildtierproben

Tabelle 6: Anzahl, Geschlecht und Alter der untersuchten Reh- und Muffelwildproben an den einzelnen Standorten

Tabelle 7: Verwendete PCR-Primer und physikalische Bedingungen der PCR-Untersuchung (*A. phagocytophilum/msp2*)

Tabelle 8: Verwendete PCR-Primer und physikalische Bedingungen der PCR-Untersuchung (*A. phagocytophilum/16S rRNA*)

Tabelle 9: Verwendete PCR-Primer und physikalische Bedingungen der PCR-Untersuchung (*Babesia* spp. / *Theileria* spp.)

3. Material

3.1. Geräte

Thermomixer®comfort	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Nano Drop ND-1000	(PeqLab, Erlangen, Deutschland)
AB-7500 FAST Real-Time PCR System	(Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland)
Thermocycler Mastercycler®gradient	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Gelkammern verschiedener Größe	(PeqLab, Erlangen, Deutschland)
Geldokumentationssystem (UV-Licht)	(PeqLab, Erlangen, Deutschland)

3.2. Kits

QIAquick PCR Purification Kit	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
HotStarTaqPlus DNA Polymerase Kit	(Qiagen, Hilden, Deutschland)

3.3. Nukleotide, Primer

dNTP mix, PCR Grade	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
PCR Nucleotide Mix	(Roche, Mannheim, Deutschland)
BJ1, BN2	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland)
ApMsp2f, ApMsp2r	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland)
ApMsp2p (Sonde markiert mit FAM-TAMRA)	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland)
ge3a, ge10r	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland)
ge9f, ge2	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland)
TH for, TH rev	(Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland)

3.4. 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 AcetatPuffer	(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™Nucleid Acid stain, 10.000x in H ₂ O	(Biotium Hayward, USA)
Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder	(Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)
6x DNA Loading Dye	(Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)

XI. DANKSAGUNG

Mein Dank geht an Herrn Prof. Dr. Kurt Pfister, der mir den Beginn dieser Arbeit am Lehrstuhl für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie möglich gemacht hat.

Als nächstes möchte ich mich ganz besonders bei meiner jetzigen Doktormutter und Betreuerin PD Dr. Cornelia Silaghi bedanken, die fachlich außerordentlich kompetent und voller Einsatzbereitschaft den Fortgang meiner Arbeit begleitet hat. Ganz besonders danken möchte ich ihr für ihre fast unerschöpfliche Geduld und die Unterstützung bei der Korrektur der Veröffentlichungen und meiner Dissertation.

Als nächstes möchte ich mich bei Dr. Steffen Rehbein und den Jagdausübungsberechtigten der einzelnen Standorte für das Sammeln und zur Verfügung stellen der Wildtierproben bedanken, ohne die diese Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

Großer Dank gilt Claudia Thiel, die mich in die notwendigen Arbeitsabläufe im Labor eingelernt hat und mir immer mit helfender Hand und Rat zur Seite stand.

Ebenfalls großer Dank gilt Dr. Dietmar Hamel, ohne seine Hilfe wäre die Statistik gescheitert.

Ein herzlicher Dank geht an alle Mitarbeiter des Diagnostiklabors, allen voran an Andrea Mihalkov und Ute Maurer, und an alle weiteren Mitarbeiter des Lehrstuhls für Vergleichenden Tropenmedizin und Parasitologie, die sich mir gegenüber stets kollegial, äußerst hilfsbereit und überaus freundlich gezeigt haben und mir eine angenehme Zeit am Institut möglich gemacht haben.

Zuletzt möchte ich ganz besonders meinem Mann Andreas danken, da ohne ihn diese Arbeit nie abgeschlossen worden wäre, sowie meiner Familie und meinen Freunden, die mich in der ganzen langen Zeit unterstützt haben und immer wieder für neue Motivation gesorgt haben.