

**Untersuchungen zum Mikrobiom
weiblicher *Ixodes-ricinus*-Zecken
unter besonderer Berücksichtigung
des Mitteldarms und der Speicheldrüsen**

von Anna Wiesinger

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

**Untersuchungen zum Mikrobiom
weiblicher *Ixodes-ricinus*-Zecken
unter besonderer Berücksichtigung
des Mitteldarms und der Speicheldrüsen**

von Anna Wiesinger

aus Traunstein

München 2024

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

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Tag der Promotion: 10. Februar 2024

Allen, die mich unterstützt haben

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1	Das Mikrobiom	3
1.1	Definitionen.....	4
1.2	Die Koevolution zwischen dem Wirt und den Mikroben	6
1.3	Durchführung einer Mikrobiomanalyse	9
1.3.1	Planung, Probennahme und DNA-Isolation.....	9
1.3.2	Bibliotheken-Vorbereitung.....	10
1.3.3	Clusterbildung	11
1.3.4	Sequenzierung	13
1.3.5	Bioinformatische Datenanalyse.....	14
2	Zecken und zeckenübertragene Infektionen	16
2.1	Allgemeines zu Zecken	16
2.2	Der Gemeine Holzbock (<i>Ixodes ricinus</i>).....	16
2.2.1	Morphologie und Anatomie	16
2.2.1.1	Mitteldarm.....	18
2.2.1.2	Speicheldrüsen	19
2.2.2	Lebenszyklus.....	20
2.2.3	Mechanismus der Blutmahlzeit und der Übertragung von <i>Bbsl</i>	22
2.3	Zeckenübertragene Infektionen.....	27
2.3.1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> und Infektion	27
2.3.2	<i>Borrelia</i> spp. und Infektion	28
2.3.2.1	Lyme-Borreliose.....	29
2.3.2.2	Rückfallfieber.....	30
2.3.3	<i>Rickettsia</i> spp. und Infektion.....	31
3	Das Zeckenmikrobiom	32
3.1	Potentielle Endosymbionten im Zeckenmikrobiom	33
III.	PUBLIKATION	38
1	Publikation Zeckenmikrobiom	38

IV.	DISKUSSION	62
1	Besonderheiten bei der Sequenzierung von Zeckenproben	62
2	Das Mikrobiom der weiblichen <i>Ixodes-ricinus</i>-Zecken	64
2.1	Das Mikrobiom des Mitteldarms	65
2.2	Das Mikrobiom der Speicheldrüsen.....	68
2.3	Einflüsse auf das Zeckenmikrobiom.....	69
2.4	Pathogene Bakterien im Zeckenmikrobiom.....	70
3	Manipulation des Zeckenmikrobioms und Impfstoffentwicklung	71
V.	ZUSAMMENFASSUNG	77
VI.	SUMMARY.....	79
VII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	81
VIII.	DANKSAGUNG	127

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AB	Antibiotikum
ATP	Adenosintriphosphat
BadR	<i>Borrelia</i> host adaption Regulator
BbsI	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato
Bbss	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto
BosR	<i>Borrelia</i> oxidative stress Regulator
Cand.	<i>Candidatus</i> (Def.: Bakterium, welches noch nicht kultiviert werden konnte)
c-di-GMP	Cyclisches Diguanylat Guanosinmonophosphat
CLE	<i>Coxiella</i> -like endosymbionts (dt. <i>Coxiella</i> -ähnliche Endosymbionten)
DC	electron dense-cored cell (dt. elektronendichte Zelle)
DNA	deoxyribonucleic acid (dt. Desoxyribonukleinsäure)
DTN	Dityrosin-Netzwerk
Duox	Duale Oxidase
FLE	<i>Francisella</i> -like endosymbionts (dt. <i>Francisella</i> -ähnliche Endosymbionten)
Hk1-Rrp1	Hybrid-Histidin-Sensorkinase-1- Diguanylat-Cyclase-Reaktionsregulator-1
IgG, IgM	Immunglobulin G, M
IMNGS	Integrated Microbial Next Generation Sequencing
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
IricES1	<i>Ixodes ricinus</i> Endosymbiont 1
ISE6-Zellen	<i>Ixodes-scapularis</i> -embryonic-6-Zellen
MDS	Multidimensionale Skalierung
MSF	Mediterranean spotted fever (dt. Mittelmeerfleckfieber)
NaClO	Natriumhypochlorit
OTU	operational taxonomic unit (dt. operationale taxonomische Einheit)
OspA, B, C	outer surface protein A, B, C (dt. Oberflächenprotein A, B, C)
PCR	polymerase chain reaction (dt. Polymerase-Kettenreaktion)
PIXR	protein of <i>I. scapularis</i> with reeler domain
PM	Peritrophische Membran
RB	round bodies (dt. Rundkörper)

RC	electron lucent reticulate cell (dt. elektrondurchlässige, netzartige Zelle)
RNA	ribonucleic acid (dt. Ribonukleinsäure)
RpoS/N	RNA-Polymerase sigma S/nitrogen-limitation N
Salp	salivary protein (dt. Speicheldrüsenprotein)
SBS	sequencing by synthesis (dt. Sequenzierung durch Synthese)
spp.	Spezies (Plural)
subsp.	Subspezies
TROSPA	tick receptor for OspA (dt. Zeckenrezeptor für OspA)
zOTU	zero-radius OTU

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Definition der Begrifflichkeiten in der Mikrobiomforschung	5
Abbildung 2:	Theorien der Mikroben-Wirt-Beziehung	8
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der 16S-rRNA.....	10
Abbildung 4:	Bibliotheken-Vorbereitung der <i>16S-rRNA</i> -Genamplikon- Sequenzierung	11
Abbildung 5:	Clusterbildung mit Brückenamplifikation.....	12
Abbildung 6:	Sequenzierung durch Synthese eines Vierkanalsystems.....	13
Abbildung 7:	<i>Ixodes-ricinus</i> -Zecken dargestellt mittels Stereomikroskopie	17
Abbildung 8:	Lebenszyklus von <i>Ixodes-ricinus</i> -Zecken.....	21
Abbildung 9:	Mechanismus der Borrelien-Übertragung (<i>Bbsl</i>).....	26
Abbildung 10:	α -Diversität und β -Diversität der Zeckenmikrobiomstudie	65
Abbildung 11:	Parameter der α -Diversität für jedes Entwicklungsstadium.....	69
Abbildung 12:	Netzwerkanalyse der Darmmikrobiota von <i>Ixodes-ricinus</i> - Nymphen	73

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	<i>Borrelia-burgdorferi</i> -sensu-lato-Komplex in <i>I. ricinus</i> -Zecken	29
Tabelle 2:	Prävalenzen der pathogenen Bakterien im Zeckenmikrobiom	71

I. EINLEITUNG

„Human beings and the natural world are on a collision course.“

– Henry W. Kendall, 1992 (KENDALL, 2000)

Das waren die einleitenden Worte der ersten Warnung der Wissenschaftler an die Weltbevölkerung über den anthropogenen Klimawandel von 1992. Die Intention der Wissenschaftler war es, ein Bewusstsein dafür zu schaffen, dass der menschliche Einfluss die Zukunft der Erde ernsthaft gefährdet. Im Mittelpunkt dieser Warnung steht die Umweltzerstörung durch die Abholzung der Regenwälder, das Artensterben, die Überfischung der Weltmeere, die Ausbeutung der Wasserressourcen und die Folgen des Ozonlochs (KENDALL, 2000). Diese Warnung unterstützten damals ca. 1.700 Wissenschaftler mit ihrer Unterschrift. Dadurch wurde die Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) gegründet, die durch weitere, öffentliche Warnungen eine stärkere Anerkennung der mikrobiellen Forschung für die Bewältigung des Klimawandels schaffen will. Denn mikrobielles Leben ist das Stützsystem der Biosphäre und Prozesse innerhalb der Biosphäre sind von Mikroorganismen abhängig (CAVICCHIOLI *et al.*, 2019). Der heutige Begriff des One-Health-Gedankens entspringt daraus. Er wird als der Mehrwert definiert, der erreicht wird, wenn der Zusammenhang zwischen der Gesundheit der Menschheit und der Tierwelt, und der Erhaltung des uns umgebenden Ökosystems hergestellt wird (ZINSSTAG *et al.*, 2020). In einer gesunden Umwelt leben also gesunde Tiere und damit auch gesunde Menschen. Wenn dieses Gleichgewicht durch den anthropogenen Klimawandel gestört wird, hat das nicht nur Auswirkungen auf unsere Umwelt, sondern auch auf die Tierwelt und die humane Gesundheit. Infolgedessen wird die globale Ausbreitung von Vektoren und durch Vektoren übertragene Infektionserreger begünstigt. Aufgrund ihres zoonotischen Potentials besteht eine erhöhte Gefährdung für die öffentliche Gesundheit (CAVICCHIOLI *et al.*, 2019). Dazu zählen durch Mosquitos übertragene Krankheiten wie Malaria und das Dengue-Fieber und durch Zecken übertragene Krankheiten wie die Lyme-Borreliose oder die Frühsommer-Meningoenzephalitis (TOLLE, 2009; BOULANGER *et al.*, 2019). Durch höhere Temperaturen breiten sich Vektoren in Regionen aus, in denen vorher ungünstige klimatische Bedingungen herrschten (ALKISHE *et al.*, 2017), und die Übertragungseffizienz steigt an. Der Klimawandel begünstigt eine verkürzten

Entwicklungszyklus der Vektoren. Außerdem haben Vektoren innerhalb ihrer Lebenszeit die Möglichkeit, mehrere Wirte aufzusuchen und damit Pathogene mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu übertragen (CAVICCHIOLI *et al.*, 2019). Zecken sind Arthropoden, die extrem abhängig von ihrer Umgebungstemperatur sind (SONENSHINE & ROE, 2014; REQUENA-GARCÍA *et al.*, 2017). Die meiste Zeit ihres Lebens verbringen sie abseits des Wirtes in der Umwelt (OSTFELD & BRUNNER, 2015). Ebenso wird eine Reihe von Prozessen innerhalb des Lebenszyklus der Zecken, wie die Wirtssuche durch Temperaturveränderungen gesteuert (STEERE *et al.*, 2016; REQUENA-GARCÍA *et al.*, 2017). Höhere Temperaturen in den Winterperioden begünstigen daher eine fast ganzjährige Suche nach geeigneten Wirten (DAUTEL *et al.*, 2008). Die Größe der Zeckenpopulationen steigt an, und diese breiten sich in nördlichere Regionen und in höhere Vegetationsstufen aus (DANIEL, 1993; LINDGREN & GUSTAFSON, 2001; GARCIA-VOZMEDIANO *et al.*, 2020). Mit ihrer Ausbreitung steigt die Wahrscheinlichkeit der Übertragung pathogener Infektionserreger an Fehlwirte, wie an den Menschen. Nie war es wichtiger, die Ausbreitung von durch Zecken übertragenen Erkrankungen einzudämmen als in der Zeit des Klimawandels.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, das Mikrobiom von weiblichen *Ixodes ricinus*-Zecken mittels einer *16S-rRNA*-Genamplikon-Sequenzierung zu bestimmen, um die mikrobiellen Zusammenhänge innerhalb des Zeckenmikrobioms besser zu verstehen. Es sollen essentielle Bakterien, sogenannte Endosymbionten, beschrieben werden, die überlebenswichtig für die Zecke sind und eine wesentliche Rolle bei der Übertragung der Pathogene spielen. Dabei wurden nicht nur gesamte, weibliche Zecken untersucht, sondern auch Zeckenorgane, wie der Mitteldarm und die Speicheldrüsen, da sie bei der Übertragung von pathogenen Bakterien ausschlaggebend sind. Diese Arbeit beschreibt die derzeitige Prävalenzen pathogener, durch Zecken übertragener Bakterien an drei verschiedenen Standorten in der Umgebung von München und im Landkreis Traunstein. Sie leistet außerdem einen erheblichen Beitrag zum besseren Verständnis der mikrobiellen Abläufe im Zeckenmikrobiom, was dazu dienen soll, einen wunden Punkt innerhalb dieses biologischen Systems zu entdecken. Diese Angriffsfläche (z. B. in Form eines essentiellen Bakteriums) kann im nächsten Schritt hilfreich für die Entwicklung von effektiven Bekämpfungsmethoden gegen Zecken sein und soll die Ausbreitung durch Zecken übertragener Krankheiten mit Hinblick auf den One-Health-Ansatz verringern.

II. LITERATURÜBERSICHT

1 Das Mikrobiom

Die Erforschung und die Beeinflussung bestimmter Mikrobiome ist längst nicht mehr nur auf die wissenschaftliche Ebene beschränkt (BERG *et al.*, 2020). Denn auch die breite Öffentlichkeit hat inzwischen das Ziel, mit bewusster Ernährung ein gesundes Darmmikrobiom zu fördern. Außerdem soll das Erscheinungsbild von bestimmten Erkrankungen mithilfe der Mikrobiota gemildert werden. Hierbei bietet die humane Darmmikrobiomforschung Hoffnung auf neue therapeutische Ansätze in Bezug auf Erkrankungen, wie Adipositas (TSENG & WU, 2019), Diabetes mellitus Typ II (LAU *et al.*, 2021) oder der rheumatoiden Arthritis (HE *et al.*, 2022; YU *et al.*, 2022), die unter dem Einfluss der Exposition von bestimmten Mikroorganismen stehen. Die mikrobielle Darmgesundheit scheint außerdem im Zusammenhang mit psychischen Erkrankungen, wie Depressionen und Angstzuständen zu stehen (PEIRCE & ALVIÑA, 2019).

Mit der Entwicklung der Next-Generation-Sequenzierung kann nun die Gesamtheit aller Mikroorganismen inklusive bisheriger, nicht-kultivierbarer Bakterien eines Makroorganismus bestimmt werden (WHEELER *et al.*, 2008). Als langfristiges Ziel gilt es, das Darmmikrobiom so detailliert zu verstehen, dass effektiv eingegriffen werden kann, um entsprechende dysbiotische Prozesse aufzulösen und ein eubiotisches Gleichgewicht wiederherzustellen (BERG *et al.*, 2020). Eine gesunde Mikrobiota ist der künftige Schutzschild im Kampf gegen Krankheiten (STACY *et al.*, 2021; HOU *et al.*, 2022).

Um das Mikrobiom von gesunden Menschen zu charakterisieren, wurde 2007 das Human Microbiome Project ins Leben gerufen. Der Fokus lag dabei auf dem nasalen, oralen und gastrointestinalen Mikrobiom sowie auf dem der Haut und des Urogenitaltrakts (TURNBAUGH *et al.*, 2007). In einer zweiten Phase des Projekts wurden die dynamischen Veränderungen im Mikrobiom und im Wirt unter drei Bedingungen untersucht: während der Schwangerschaft und bei einer Frühgeburt, bei entzündlichen Darmerkrankungen und mit Stressfaktoren, unter denen Patienten mit Prädiabetes leiden (THE INTEGRATIVE HMP (IHMP) RESEARCH NETWORK CONSORTIUM, 2019). Dank dieses Projekts konnte eine erste Referenzdatenbank entwickelt werden, auf die sich zukünftige humane Mikrobiomstudien beziehen können.

In der Tiermedizin werden die bereits gewonnenen Erkenntnisse der Mikrobiomforschung z. B. auf die Untersuchung des Mikrobioms von Hunden, Katzen und Labormäusen angewendet (PILLA & SUCHODOLSKI, 2021; WENDERLEIN *et al.*, 2021; WERNER *et al.*, 2021; SUCHODOLSKI, 2022). Um Vektor übertragene Erkrankungen effektiver kontrollieren zu können, wird auch hier die Methodik der *16S-rRNA*-Genamplikon-Sequenzierung verwendet. Hierdurch kann das Gesamtmikrobiom oder das Mikrobiom wichtiger Organe im Übertragungsprozess von Pathogenen näher bestimmen werden (BONNET *et al.*, 2017; SHAW & CATTERUCCIA, 2019; DJIHINTO *et al.*, 2022).

1.1 Definitionen

In der Literatur finden sich zahlreiche Definitionen bezüglich des Mikrobiombegriffs (WHITESIDE *et al.*, 2015; ROGERS & ZHANG, 2016; HO & BUNYAVANICH, 2018). Eine gängige Definition beschreibt das Mikrobiom als den Lebensraum einschließlich aller Mikroorganismen, deren Genomen und den umgebenden Umweltbedingungen (MARCHESI & RAVEL, 2015). Das Wort „Mikrobiom“ stammt aus dem Griechischen und setzt sich aus den Worten „mikrós“ und „bios“ zusammen, das mit „klein“ und „Leben“ übersetzt werden kann. WHIPPS *et al.* (1988) prägten erstmals den Begriff des Mikrobioms als die Gesamtheit aller Mikroorganismen in der Rhizosphäre. Genauere Definitionen schließen inzwischen nicht nur Bakterien, sondern auch Viren, Archaeen und Protozoen mit ein (MARCHESI & RAVEL, 2015; BERG *et al.*, 2020). In der Mikrobiomforschung wird hauptsächlich von mikrobiellen oder bakteriellen Gemeinschaften gesprochen, die eine Ansammlungen von verschiedenen Spezies darstellen, in denen die Organismen in einer umgebenden Umwelt miteinander interagieren (KONOPKA, 2009). Dies erweitert die Definition des Mikrobiom insofern, da mikrobielle Gemeinschaften mitsamt ihren Eigenschaften, Funktionen sowie Wechselwirkungen mit der Umwelt eingeschlossen werden.

Die Begrifflichkeiten Mikrobiom und Mikrobiota werden oft synonym verwendet, die Definitionen grenzen sie jedoch klar voneinander ab (Abbildung 1). Die Mikrobiota beschreibt alle lebenden Organismen eines Mikrobioms (MARCHESI & RAVEL, 2015). Die Definition des Mikrobioms umfasst somit die Mikrobiota und zusätzlich einen sogenannten Aktionsraum an mikrobiellen Strukturelementen (BERG *et al.*, 2020). Es wird weiterhin diskutiert, ob Phagen, Plasmide, Prionen, Viroide und freie DNA mit zum Mikrobiom gezählt werden, da diese genau genommen als nicht lebende

Organismen bezeichnet und somit vom Mikrobiom ausgeschlossen werden (DUPRÉ & O'MALLEY, 2009; BERG *et al.*, 2020). Nach Whipps' ursprünglicher Definition beinhaltet der Begriff Mikrobiom allerdings die Gesamtheit der Moleküle, die am Stoffwechsel der Mikroorganismen beteiligt sind und produziert werden (WHIPPS *et al.*, 1988). Dazu zählen auch strukturelle Elemente, Metaboliten und Moleküle, die vom Wirt produziert und von Umweltbedingungen strukturiert werden. Diese genannten Moleküle werden hier alle in die Definition des Mikrobioms aufgenommen (BERG *et al.*, 2020). Manche Autoren werden noch exakter und verwenden den Begriff des Bakterioms (PORTILLO *et al.*, 2019; LAM *et al.*, 2022) – ein Neologismus in Anlehnung an das Virom, welches entsprechend nur virale Gemeinschaften innerhalb des Mikrobioms beschreibt. Allerdings wird dieser Begriff nirgends klar definiert.

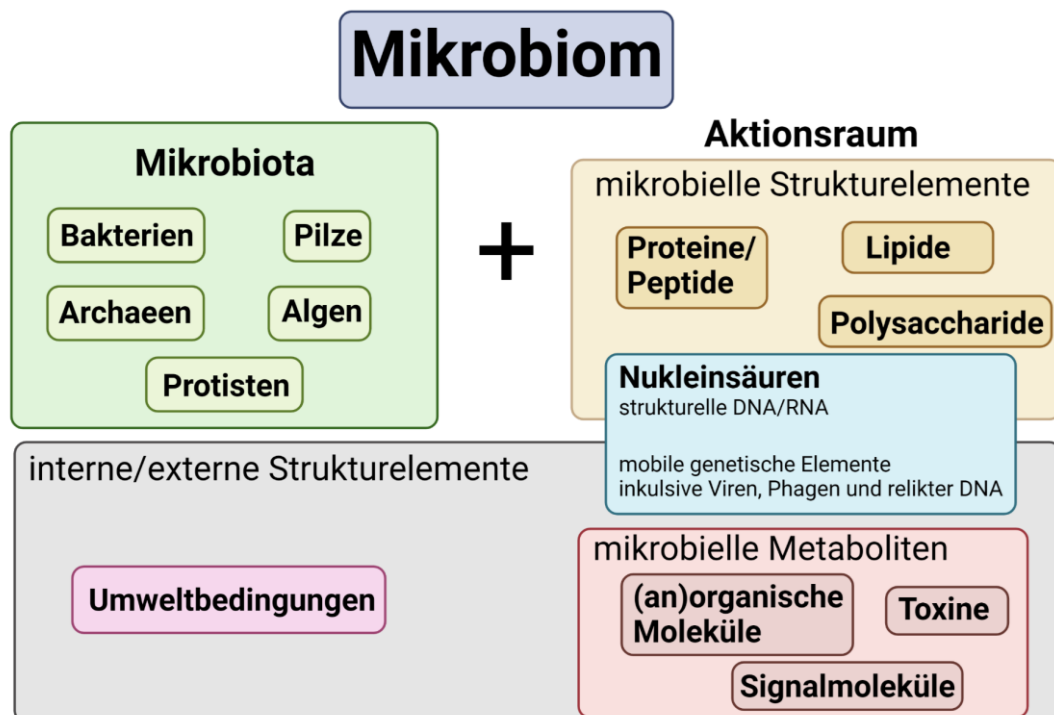


Abbildung 1: Definition der Begrifflichkeiten in der Mikrobiomforschung

Das Mikrobiom wird definiert als die Mikrobiota, bestehend aus der Gesamtheit von Bakterien, Pilzen, Archaeen, Protisten und Algen, und dem Aktionsraum mit mikrobiellen Strukturelementen wie Proteine oder Peptide, Lipide, Polysaccharide sowie struktureller DNA oder RNA und mit mikrobiellen Metaboliten wie an- und organischen Molekülen, Toxinen und Signalmolekülen. Die vorherrschenden Umweltbedingungen zählen zu den externen Strukturelementen.

In dieser Arbeit werden die Begriffe entsprechend dieser Definitionen verwendet.

Modifiziert und übersetzt nach BERG *et al.* (2020)

Erstellt mit biorender.com

1.2 Die Koevolution zwischen dem Wirt und den Mikroben

Die am häufigsten zitierte Definition des Mikrobioms stammt von Lederberg und separiert pathogene von nützlichen und neutralen Mikroorganismen gegenüber ihren mikrobiellen Interaktionen und Einflüssen auf den Wirt (LEDERBERG & MCCRAY, 2001). Man spricht von einer antagonistischen Mikroben-Wirt-Koevolution bei negativen, parasitären Wechselwirkungen und von einer mutualistischen Mikroben-Wirt-Koevolution bei positiven, symbiotischen Interaktionen (Abbildung 2). Die Koevolution beschreibt dabei einen Evolutionsprozess, bei dem sich die Anpassung zweier stark interagierender Arten gegenseitig beeinflusst (MORAN, 2007). Um ein definiertes Mikrobiom ganzheitlich zu verstehen, muss diese Mikroben-Wirt-Koevolution berücksichtigt werden. Dieser holistische Ansatz erklärt den Zustand eines gesunden Organismus mit einem förderlichen Zusammenspiel von Wirt und seinem Mikrobiom. Eine gesundheitsfördernde Eubiose wird außerdem durch mikrobielle Vielfalt erreicht (BERG *et al.*, 2017; LARSEN & CLAASSEN, 2018) und spielt eine Schlüsselrolle in der Prophylaxe von Krankheiten. Diese Theorie hinterfragt demnach eine Reduzierung der mikrobiellen Diversität durch ein zu sauberes, keimfreies Umfeld und die ständige aktive Beseitigung von Mikroorganismen durch übermäßige Hygiene (STRACHAN, 1989; BLOOMFIELD *et al.*, 2006; BLASER, 2011). Sobald eine mikrobielle Dysbiose – also ein Pathobiom – vorliegt, treten laut diesem Ansatz gehäuft Erkrankungen auf (WHIPPS *et al.*, 1988; HOOKS & O'MALLEY, 2017; HOU *et al.*, 2022). Die Grenze zwischen Eubiose und Dysbiose auf der Suche nach *dem* gesunden Mikrobiom kann trotz zahlreicher Studien nicht eindeutig gezogen werden und bleibt zukünftig Gegenstand der aktuellen Forschung, vor allem bezüglich des humanen Darmmikrobioms (ÁLVAREZ *et al.*, 2021; SHANAHAN *et al.*, 2021).

“Perhaps one of the most important changes we can make is to supercede the 20th-century metaphor of war for describing the relationship between people and infectious agents. A more ecologically informed metaphor, which includes the germs’-eye view of infection, might be more fruitful.

Consider that microbes occupy all of our body surfaces. Besides the disease-engendering colonizers of our skin, gut, and mucous membranes, we are host to a poorly cataloged ensemble of symbionts to which we pay scant attention. Yet they are equally part of the superorganism genome with which we engage the rest of the biosphere.”

– Joshua Lederberg, “Infectious History” 2000, (LEDERBERG, 2000)

Mit der Entdeckung der Mikroorganismen durch Anthony van Leeuwenhoek im 17. Jahrhundert und der Kultivierung von individuellen Bakterien und Viren in entsprechenden Nährmedien nahmen damalige Mikrobiologen an, dass ein einziger, individueller Organismus an einem Infektionsprozess beteiligt sei und eine Krankheit auslöse (GEST, 2004). Diese Theorie wird heutzutage als Separationstheorie bezeichnet (BERG *et al.*, 2020) und setzt einzelne Mikroorganismen als „eindringende Feinde“ in den Fokus des Krankheitsgeschehens (INSITUTE OF MEDICINE, 2006). Der angegriffene Wirt wird dabei wie in einem Krieg beschädigt und bekämpft. Daher geht man im Krankheitsfall auf die systematische Suche nach der mikrobiellen Ursache. Als Therapie werden heutzutage antimikrobielle Medikamente verschrieben, um den „Eindringling“ erfolgreich zu bekämpfen. Es ist essentiell, sowohl in der humanmedizinischen als auch in der veterinärmedizinischen Praxis, den Einsatz von antimikrobiellen Medikamenten abzuwägen und den damit einhergehenden Einfluss auf den gesamten Organismus miteinzubeziehen (INSTITUTE OF MEDICINE *et al.*, 2009; PATANGIA *et al.*, 2022). Damals konnten nur bekannte Bakterien kultiviert werden, unbekannte, bislang nicht-kultivierbare Bakterien konnten nicht näher bestimmt werden. Der oben beschriebene Paradigmenwechsel zu einem holistischen Ansatz konnte erst durch die Entwicklung neuer Labortechniken im 20. und 21. Jahrhundert stattfinden (INSTITUTE OF MEDICINE *et al.*, 2009). Die verbesserte Mikroskopie ließ erstmals zu, Bakterien und ihre Interaktionen in ihrer Umgebung zu beobachten und in den Kontext ihres Wirts zu bringen (HEIMSTÄDT, 1911). Die Gesamtgenom- und die spätere Metagenomanalyse ermöglichen nun eine massiv parallele oder tiefe Sequenzierung von DNA durch die Entwicklung der neuartigen Next-Generation-Sequenzierungstechniken (BEHJATI & TARPEY, 2013). Von hier an war es möglich, die Gesamtheit aller Mikroorganismen – unabhängig von ihrer Kultivierbarkeit – genetisch und taxonomisch zu bestimmen.

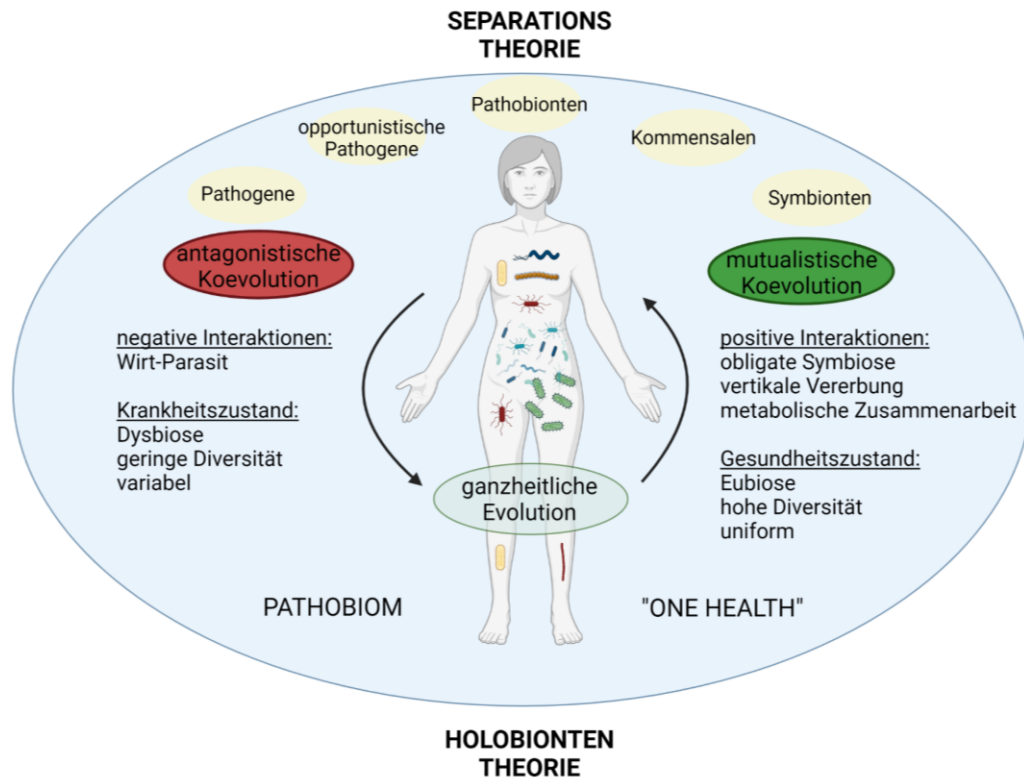


Abbildung 2: Theorien der Mikrogen-Wirt-Beziehung

Darstellung des veränderten Verständnisses der Mikrogen-Wirt-Beziehungen von der Separationstheorie zu einem neueren, holistischen Ansatz.

Laut des Separationsgedanken (oben) sind Mikroorganismen entweder schädlich (Pathogene), neutral (opportunistische Pathogene, Pathobionten, Kommensalen) oder nützlich (Symbionten) für die Interaktion mit dem Wirt. Die ganzheitliche Holobiontentheorie vernetzt den Wirt mitsamt seiner Mikrobiota und erkennt die zusammenhängenden Dynamiken darin als eine sich zusammen entwickelnde Einheit (Holobiont) an. Zu dieser Einheit zählt außerdem die umliegende Umwelt und beschreibt damit den One-Health Gedanken.

Modifiziert und übersetzt nach BERG *et al.* (2020)

Erstellt mit biorender.com

1.3 Durchführung einer Mikrobiomanalyse

1.3.1 Planung, Probennahme und DNA-Isolation

Zunächst wird für eine Mikrobiomanalyse ein Ziel festgelegt – die Mikrobiomquelle, z. B. humane oder tierische Organe, wie die Haut oder das Verdauungssystem, oder eine Mikrobiomquelle aus der Umwelt, wie dem Boden oder einem Gewässer (BHARTI & GRIMM, 2021). Dafür wird eine Probenauswahl und eine signifikante Probenanzahl definiert. Meist wird eine gesunde Kontrollgruppe als Referenz in die Studie mit aufgenommen oder, im Falle einer Umweltstudie, unterschiedliche Standorte miteinander verglichen. Im besten Fall findet vor der Hauptstudie ein Vorversuch statt (BHARTI & GRIMM, 2021). Das Einbeziehen von Positiv- und Negativkontrollen ist nicht nur für den Laborablauf wichtig, sondern vor allem für die bioinformatische Auswertung – diese dienen oft zur Festlegung der Cut-Off-Werte (KNIGHT *et al.*, 2018; QIAN *et al.*, 2020). Die Probennahme stellt einen zentralen Punkt einer Mikrobiomstudie dar. Sie hat großen Einfluss auf die Ergebnisse und Interpretationen einer Studie (THOMAS *et al.*, 2012). Es ist wichtig, dass die umweltlichen Einflüsse bei der Probennahme möglichst konstant sind, um Kontaminationen zu vermeiden. Allerdings ist dies oft ein schwieriger Punkt, da Veränderungen der Temperatur, der Feuchtigkeit oder andere klimatische Einflüsse bereits große Mikrobiomveränderungen hervorbringen (THOMAS *et al.*, 2012). Bei der weiteren Verarbeitung der Proben sollte am besten so aseptisch wie möglich gearbeitet werden (SALTER *et al.*, 2014). Der Transport, die anschließende Lagerung und Kühlung der Proben beeinflusst ebenfalls die Qualität und Quantität der isolierbaren DNA (JENKINS *et al.*, 2018; HICKL *et al.*, 2019). Alternativ gibt es verschiedene chemische Konservierungsmethoden wie z. B. die Verwendung von Stabilisatoren (WENDERLEIN *et al.*, 2021; KEIZ *et al.*, 2023). Im Anschluss erfolgt eine entsprechende DNA-Isolation. Die Wahl des Protokolls hat enorme Auswirkungen auf die Ergebnisse, da die Zellwand gram-positiver Bakterien aufgrund ihrer Peptidoglykan-Schicht schwieriger aufzubrechen ist als die der gram-negativen Bakterien (CHATEAU *et al.*, 2019). Diese Lyse kann entweder mittels mechanischer oder chemischer Methoden erreicht werden (AMMAZZALORSO *et al.*, 2015; PSIFIDI *et al.*, 2015). Die häufigsten Sequenzierungstechniken, die für die mikrobielle Identifikation und Genotypisierung benutzen werden, sind die Genamplikon- oder Markergen-basierten Sequenzierungen wie die *16S-rRNA*-Genamplikon-Sequenzierung und die Shotgun-Metagenom-Sequenzierung. Im Folgenden wird auf die Methodik der *16S-rRNA*-Genamplikon-Sequenzierung näher

eingegangen, denn sie wird als Goldstandard für die mikrobielle Typisierung verwendet (BAKER *et al.*, 2003; PEL *et al.*, 2018).

1.3.2 Bibliotheken-Vorbereitung

Das *16S-rRNA*-Gen kodiert für die RNA-Komponente der kleinen ribosomalen 30S-Untereinheit, die in allen prokaryotischen Zellen inklusive der Bakterien und Archaeen vorhanden ist (FUKUDA *et al.*, 2016). Mit 1.500 Basenpaaren ist das Gen relativ kurz und lässt eine schnelle Analyse zu (Abbildung 3). Die 16S-rRNA besteht aus konservierten Regionen sowie aus neun hypervariablen Regionen (V1-V9). Konservierte Regionen innerhalb eines Gens sind Bereiche, die sich kaum oder nur sehr wenig über die Zeit ändern, da sie für überlebenswichtige Proteine für die Reproduktion oder das Wachstum kodieren. Hypervariable Regionen beinhalten Informationen für die taxonomische Einordnung der Bakterien und bieten sich somit als Zielgen für eine Sequenzierung an (FUKUDA *et al.*, 2016; BHARTI & GRIMM, 2021).

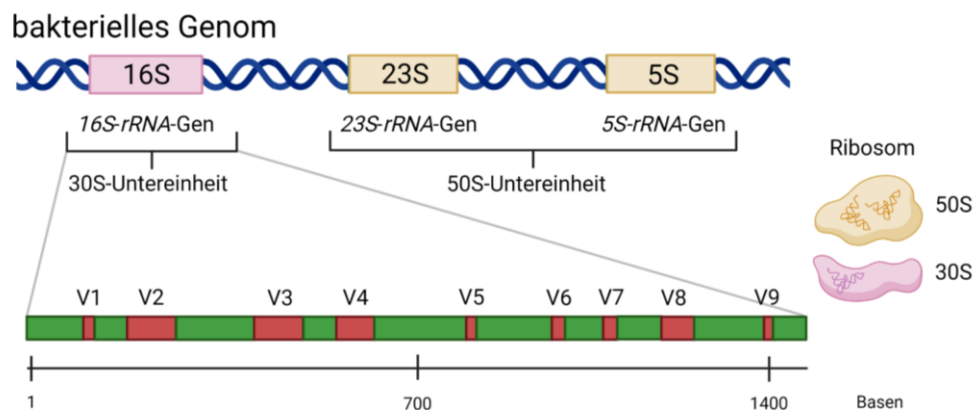


Abbildung 3: Schematische Darstellung der 16S-rRNA

Das abgebildete bakterielle Teilgenom, bestehend aus dem *23S-rRNA*-Gen und dem *5S-rRNA*-Gen, kodiert für die 50S-Untereinheit der Ribosomen. Die *16S-rRNA* kodiert für die kleine Untereinheit (30S) und besteht aus konservierten Regionen (grüne Genabschnitte) und neun hypervariablen Regionen, den V-Regionen (rote Genabschnitte).

Modifiziert und übersetzt nach FUKUDA *et al.* (2016) und ABELLAN-SCHNEYDER *et al.* (2021)

Erstellt mit biorender.com

Für den weiteren Ablauf einer Mikrobiomanalyse werden eine variable Region und die entsprechenden Primer ausgewählt. Die V3-V4 Region (HMP, 2012), die V1-V3 Region (ALLEN *et al.*, 2016) und die V3-V5 Region (ABELLAN-SCHNEYDER *et al.*, 2021) werden am häufigsten für derartige Analysen verwendet. Für die Bibliotheken-Erstellung werden zwei aufeinanderfolgende PCRs durchgeführt, um die extrahierte

DNA für die Bindung an die Fließzelle kompatibel zu machen. Die erste PCR dient der Vervielfältigung der entsprechenden V-Region. Während der zweiten PCR werden sogenannte Adaptoren an die jeweiligen Enden der PCR-Produkte angehängt, um eine individuelle Probenzuordnung während des Sequenzierungsvorgangs zu gewährleisten (Abbildung 4). Die Adaptoren bestehen jeweils aus der Bindungsregion für die Clusterbildung (P5 und P7), der Primerbindungsregion für die Sequenzierung (Rd1 und Rd2) und einer Indexregion für das Multiplexing, um einzelne Sequenzierungsläufe zu kombinieren. Die Indexsequenz ist eine sehr kurze, individuelle DNA-Sequenz, die es ermöglicht, zahlreiche Proben innerhalb eines Sequenzierungslaufs zu kombinieren. Man spricht auch von Barcoding. Die erstellte Sequenzierungsbibliothek wird zunächst aufgereinigt und anschließend wird der finale Pool auf eine gerätspezifische Fließzelle pipettiert (ILLUMINA INC., 2021).



Abbildung 4: Bibliotheken-Vorbereitung der 16S-rRNA-Genamplikon-Sequenzierung

Bei der Bibliotheken-Vorbereitung wird an die einzelsträngige Proben-DNA (schwarz) zunächst eine Bindungsregion für die Clustergenerierung (P5 in grün und P7 in gelb) angehängt, die komplementär zu den Oligonukleotiden der Fließzelle ist. Außerdem beinhaltet der Adaptor jeweils einen Primer am 3'- und am 5'-Ende (Rd1 in rot und Rd2 in lila) für den eigentlichen Prozess der Sequenzierung. Die dargestellte Single-Index Bibliothek besitzt eine Indexregion (blau) für die individuelle Zuordnung nach dem Proben-Pooling.

Modifiziert und übersetzt nach ILLUMINA INC. (2021)

Erstellt mit biorender.com

1.3.3 Clusterbildung

Auf der Fließzelle findet nun die sogenannte Clustergeneration statt. Ein Cluster repräsentiert tausende Kopien desselben DNA-Strangs, die auf der Fließzelle eng zusammen positioniert werden. Die Fließzelle besteht aus einem Glasobjektträger, der mit länglichen Rinnen versehen ist. Jede Rinne ist mit der Sequenzierungsschemie – den Oligonukleotiden – beschichtet, die komplementär zu den Bibliotheksadaptoren sind (P5 und P7). Während der Clusterbildung hybridisieren einzelne DNA-Bibliotheken an die Oligonukleotide auf der Fließzelle und eine Polymerase verlängert den komplementären Strang (Abbildung 5). Der DNA-Doppelstrang wird denaturiert und

die originale DNA-Matrize wird abgewaschen. Der neu synthetisierte Strang ist kovalent an die Oligonukleotide der Fließzelle angeheftet. Im nächsten Schritt beginnt die Brückenamplifikation. Hierfür bindet das freie Ende des neu synthetisierten Einzelstrangs brückenmäßig an die komplementären Primer einer benachbarten Rinne der Fließzelle. Eine Polymerase verlängert den Strang erneut und bildet eine doppelsträngige Brücke aus. Diese wird wiederum denaturiert und als Ergebnis liegen zwei Kopien von kovalenten einzelsträngigen DNA-Matrizen vor. Der Prozess der Brückenamplifikation wiederholt sich, indem die beiden Einzelstränge erneut an die benachbarten, komplementären Primer der Fließzelle binden. Diese werden ein weiteres Mal durch eine Polymerase verlängert und denaturiert. Nun liegen vier Kopien kovalenter, einzelsträngiger DNA-Matrizen vor. Die Brückenamplifikation wiederholt sich, bis sich multiple Brücken formen und sich tausende identische Kopien des jeweiligen DNA-Fragments bilden (Cluster). Im anschließenden Schritt werden die Doppelstränge denaturiert und die Rückwärtsstränge (P5) werden abgewaschen. Nur die Vorwärtsstränge (P7) verbleiben für die weitere Sequenzierung (ILLUMINA INC., 2021).

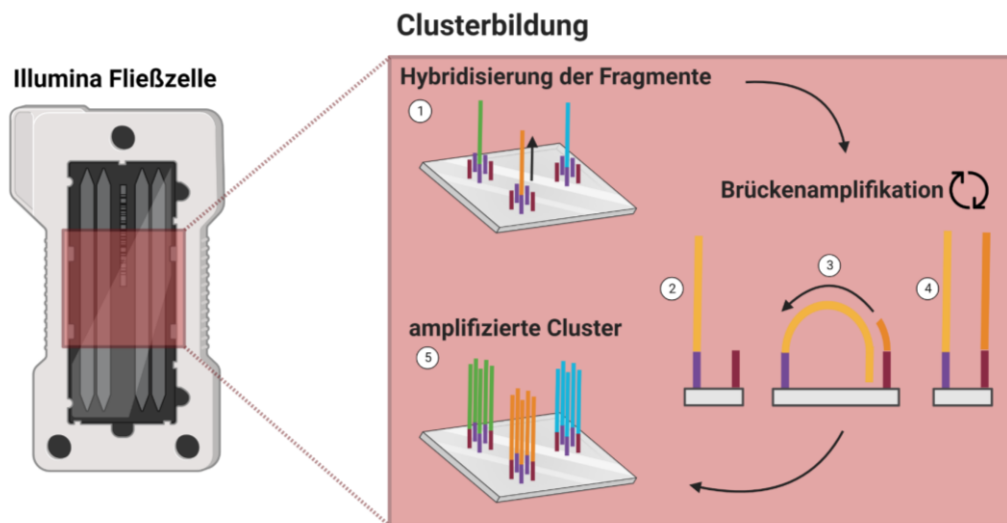


Abbildung 5: Clusterbildung mit Brückenamplifikation

Der finale Probenpool wird auf die gerätspezifische Fließzelle pipettiert. Diese ist mit Oligonukleotiden beschichtet, die komplementär mit dem Bibliotheksabschnitt P5 binden (1). Eine Polymerase verlängert die Bibliotheks-DNA, welche im nächsten Schritt abgewaschen wird. (2) Es verbleibt ein neu synthetisierter DNA-Strang (z.B. gelb). (3) Dieser bindet nun brückenähnlich an ein benachbartes Oligonukleotid (rot) einer anderen Rinne und wird mittels einer Polymerase verlängert. (4) Nach Denaturierung sind zwei kovalente Kopien des DNA-Fragments entstanden. Der Vorgang der Brückenamplifikation wiederholt sich bis tausende Kopien eines DNA-Fragments vorliegen. (5) Es bilden sich sogenannte Cluster (grün, orange, türkis).

Modifiziert und übersetzt nach ILLUMINA INC. (2021)

Erstellt mit biorender.com

1.3.4 Sequenzierung

Die Sequenzierungsprimer binden nun an die Rd1/2-Adaptorregion der verbleibenden Vorwärtsstränge. Bei der Sequenzierung durch Synthese (SBS) werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide hinzugefügt und eine Polymerase verlängert den Einzelstrang. Jede hinzugefügte Base emittiert eine individuelle Wellenlänge, dessen Intensität von einer Kamera erfasst wird. Bei der Vier-Kanal SBS, die in den häufig genutzten MiSeq Illumina-Geräten eingesetzt wird, entstehen pro Zyklus jeweils vier Bilder, um die Intensität von jedem Signal festzuhalten (Abbildung 6). Im Laufe jedes Zyklus wird eine Base angehängt. Sie erscheint daher nur auf einem der vier Bilder und definiert so die hinzugefügte Base. Dieser Vorgang wird auch Base-Call genannt. Die fluoreszierende Terminatorgruppe wird von dem hinzugefügten Nukleotid abgespalten und ein neuer Synthesesyklus kann beginnen (ILLUMINA INC., 2021).

Sequenzierung durch Synthese (SBS): Vier-Kanalsystem

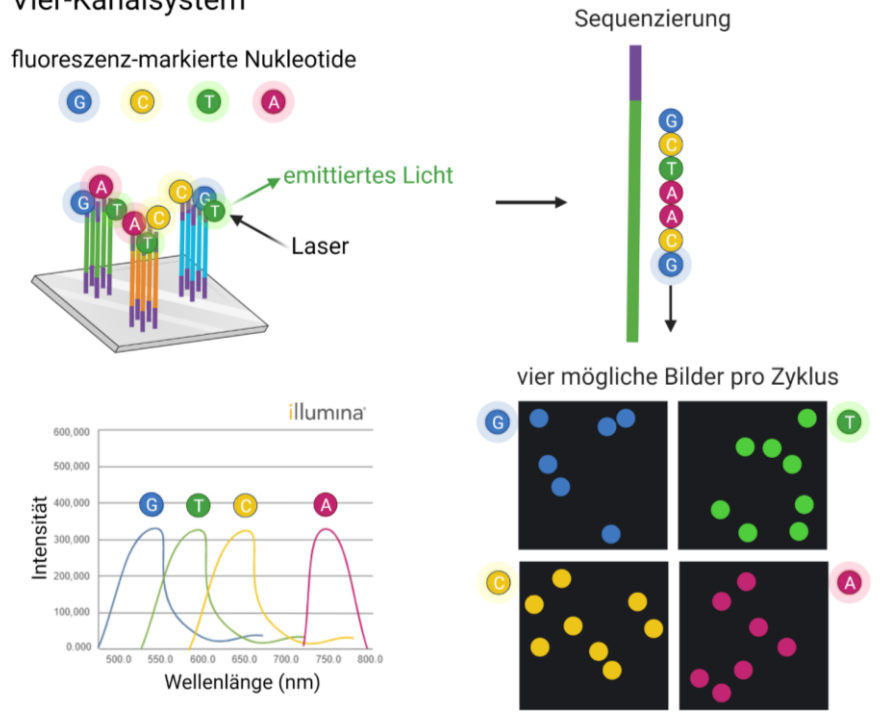


Abbildung 6: Sequenzierung durch Synthese eines Vierkanalsystems

Während des eigentlichen Sequenzierungsvorgangs werden fluoreszenz-markierte Nukleotide eingesetzt. Sie heften sich an die vorhandenen Cluster an und emittieren dabei Licht einer bestimmten Wellenlänge. Die Intensität dieser Wellenlängen wird auf einer Kamera festgehalten. Bei einem Vier-Kanalsystem entsteht pro Sequenzierungszyklus nur ein Bild, das klar definiert, um welche Base es sich handelt. Am Ende eines Zyklus wird die fluoreszierende Terminatorgruppe abgespalten und ein neuer Zyklus kann beginnen.

Modifiziert und übersetzt nach ILLUMINA INC. (2021)

Erstellt mit biorender.com

1.3.5 Bioinformatische Datenanalyse

Die Echtzeitanalyse mit Ausgabe der Bilder, die detektierten Signalintensitäten und die Base-Calls sind Teil der Primäranalyse. Außerdem wird der *Q-Score* für den Sequenzierungslauf bestimmt. Er korrespondiert mit der Wahrscheinlichkeit, dass der Base-Call fehlerhaft ist und wie sicher die Base an dieser Stelle ist. Ein durchschnittlicher *Q-Score* von $\geq Q30$ ist für den gesamten Sequenzierungslauf optimal und wird mit der Wahrscheinlichkeit angegeben, dass eine Base von 1.000 Basen fehlerhaft ist. In der Sekundäranalyse werden die Sequenzen an ein Referenzgenom angeglichen (engl. *alignment*) und demultiplext. Das bedeutet, dass die angefügten Barcodes, also die Indexsequenzen, wieder abgetrennt werden. Letztlich werden die Sequenzierungsdaten als FASTQ-Dateien ausgegeben, die mit weiteren tertiären Programmen bioinformatisch aufbereitet werden können. Eines dieser Programme ist z. B. die Integrated Microbial Next Generation Sequencing Platform (IMNGS) (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2016), das mit der OTU-basierten Pipeline (engl. *operational taxonomic units*) und der zOTU-basierten Pipeline (engl. *zero-radius operational taxonomic units*) eine Grundlage für weitere Analysen bildet. Sequenzen mit einer Übereinstimmung von mindestens 97 % clustern zu einem OTU zusammen (SCHLOSS, 2010). Die zOTUs korrigieren ergänzend Sequenzierungsfehler durch Sequenz-Entrauschung. Während OTUs dazu tendieren, Spezies in ein OTU zusammenzufassen, bieten zOTUs den Vorteil einer bestmöglichen Auflösung des Phänotyps mit einer erhöhten Aufteilung von Spezies auf mehrere zOTUs (EDGAR, 2018; ABELLAN-SCHNEYDER *et al.*, 2021). Die Software R Studios bietet mit vorgefertigten Rhea-Skripten eine Möglichkeit, Mikrobiomdaten statistisch auszuwerten. Die Rhea-Pipeline besteht aus sechs Skripten für die Normalisierung, die Berechnung der α -Diversität und der β -Diversität, die taxonomische Klasseneinteilung, den seriellen Gruppenvergleich und die Korrelation (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2017). Die Normalisierung wird als erstes durchgeführt, um störende Effekte aufgrund unterschiedlicher Probengrößen zu entfernen, da während der Sequenzierung Proben unterschiedlicher Sequenzierungslängen erstellt werden. Die Normalisierung wird mit einer *Rarefaction*-Kurve dargestellt. Sie steigt in der Regel schnell an, da die häufigste Art gefunden wird, und erreicht dann ein Plateau, wenn die seltenste Art gefunden wird (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2017). Die α -Diversität gibt die Speziesvielfalt innerhalb einer Probe an, indem vorliegende OTUs gezählt werden, die über einem festgesetzten Schwellenwert (Cut-Off-Wert) liegen (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2017). Die am häufigsten dargestellten Diversitätsindices sind der *Shannon effective* (SHANNON,

2001) und der *Simpson effective* (SIMPSON, 1949). Dagegen stellt die β -Diversität die Vielfalt zwischen verschiedenen Proben oder Gruppen dar, indem die taxonomische Ähnlichkeit beziehungsweise Entfernung mittels Bray-Curtis-Index (BRAY & CURTIS, 1957) oder dem generalisierten *UniFrac* (CHEN *et al.*, 2012) kalkuliert wird. Die graphische Darstellung dieser taxonomischen Entfernungen erfolgt über metrische oder nicht-metrische multidimensionale Skalierungs-Plots (MINCHIN, 1987) und Dendrogramme (MURTAGH & LEGENDRE, 2014). Das Skript für die taxonomische Klasseneinteilung kalkuliert die taxonomisch relativen Abundanzen für jede Probe (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2017). Alle OTUs der gleichen Taxonomie werden zusammengefasst und graphisch übersichtlich als Balkendiagramm dargestellt. Der serielle Gruppenvergleich ermöglicht den Vergleich der Zusammensetzung der mikrobiellen Profile verschiedener Probenotypen. Hierfür wird der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test verwendet (HOLLANDER *et al.*, 2013). Die Korrelationsberechnung gibt Hinweise auf gleiche oder gegenläufige Veränderungen in den einzelnen Proben (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2017).

Eine fehlende Standardisierung in der ohnehin komplexen Auswertung der Sequenzierungsdaten und die zahlreichen, verfügbaren, tertiären Programme und Referenzdatenbanken erschweren die Vergleichbarkeit von Mikrobiomstudien untereinander (BHARTI & GRIMM, 2021).

2 Zecken und zeckenübertragene Infektionen

2.1 Allgemeines zu Zecken

Zecken (Ixodida) sind blutsaugende Ektoparasiten und gehören zur Ordnung der Milben (Acari), zur Klasse der Spinnentiere (Arachnida) und zum Stamm der Gliederfüßer (Arthropoda) (BOWMAN & NUTTALL, 2008; NAVA *et al.*, 2009; SONENSHINE & ROE, 2014). Sie umfassen drei Familien – die Lederzecken (Argasidae), die Schildzecken (Ixodidae) und die Nuttalliellidae mit nur einer Art in dieser Familie (BOWMAN & NUTTALL, 2008; GUGLIELMONE *et al.*, 2010). Schildzecken unterscheiden sich von den Lederzecken in ihrer äußeren Morphologie, denn sie sind dorsal mit einem Schild (lat. *Scutum*) versehen (SONENSHINE & ROE, 2014). Dieses Merkmal fehlt bei Lederzecken. Außerdem gibt es Unterschiede in ihrer Physiologie, ihren Lebenszyklen, wie sie ihre Blutmahlzeit aufnehmen und Mikroorganismen übertragen (BOWMAN & NUTTALL, 2008; HAJDUŠEK *et al.*, 2013). Charakteristisch für Schildzecken ist die längere Dauer der Blutmahlzeit im Vergleich zu Lederzecken. Sie saugen mehrere Tage und können dabei das Hundertfache ihres Körpergewichts an Blut aufnehmen (BALASHOV, 1972; GULIA-NUSS *et al.*, 2016). Im Vergleich nehmen Lederzecken, die nur Minuten bis Stunden saugen, etwa das Zehn- bis Zwölffache ihrer Körpergröße zu (KEMP *et al.*, 1982). Etwa 80 % der Zecken zählen zu den Schildzecken. Insgesamt sind mehr als 900 Zeckenarten bekannt (BOWMAN & NUTTALL, 2008; ESTRADA-PEÑA, 2015).

2.2 Der Gemeine Holzbock (*Ixodes ricinus*)

2.2.1 Morphologie und Anatomie

Der Gemeine Holzbock (*Ixodes ricinus*) ist aufgrund seiner weiten geographischen Verbreitung einer der wichtigsten, europäischen Vertreter der Schildzecken (MEDLOCK *et al.*, 2013). Er ist ein Vektor zahlreicher Infektionserreger mit zoonotischem Potential (LINDQUIST & VAPALAHTI, 2008; SONENSHINE & ROE, 2014; STEERE *et al.*, 2016). Adulte, weibliche Zecken unterscheiden sich nicht nur in der Größe, sondern vor allem in der Morphologie von adulten, männlichen *Ixodes-ricinus*-Zecken (Abbildung 7). Während das sklerotisierte *Scutum* der männlichen Zecke die gesamte dorsale Rückenplatte (lat. *Idiosoma*) einnimmt, bedeckt es bei den weiblichen Zecken nur etwa die Hälfte (SONENSHINE & ROE, 2014). Weibliche Zecken besitzen einen weiteren, nicht sklerotisierten Teil – das meist braun-rote

Alloscutum. Das *Scutum* der *Ixodes* spp. ist glatt, ohne Furchen und grenzt sich damit von anderen Gattungen ab. Der Zeckenkopf (lat. *Capitulum*) besteht aus der Basis und den Mundwerkzeugen (lat. *Pedipalpen*, *Cheliceren* und *Hypostom*). Die paarigen *Pedipalpen* sind ein Sinnesorgan, die mittels sensorischen Sensillen die Haut des Wirtes abtasten können (SONENSHINE *et al.*, 2014). Die *Cheliceren* liegen medial der *Pedipalpen* und dorsal auf dem *Hypostom*. Sie schneiden und zerreißen die Wirtshaut an der Stichstelle (RICHTER *et al.*, 2013). Das *Hypostom* liegt ebenfalls medial zwischen den *Pedipalpen* und ventral der *Cheliceren*. Es wird während des Zeckenstichs mit seinen Widerhaken in der Wirtshaut verankert und beinhaltet den Nahrungskanal, durch den die Blutmahlzeit aufgenommen wird und der Zeckenspeichel abgegeben wird (SONENSHINE & ROE, 2014).

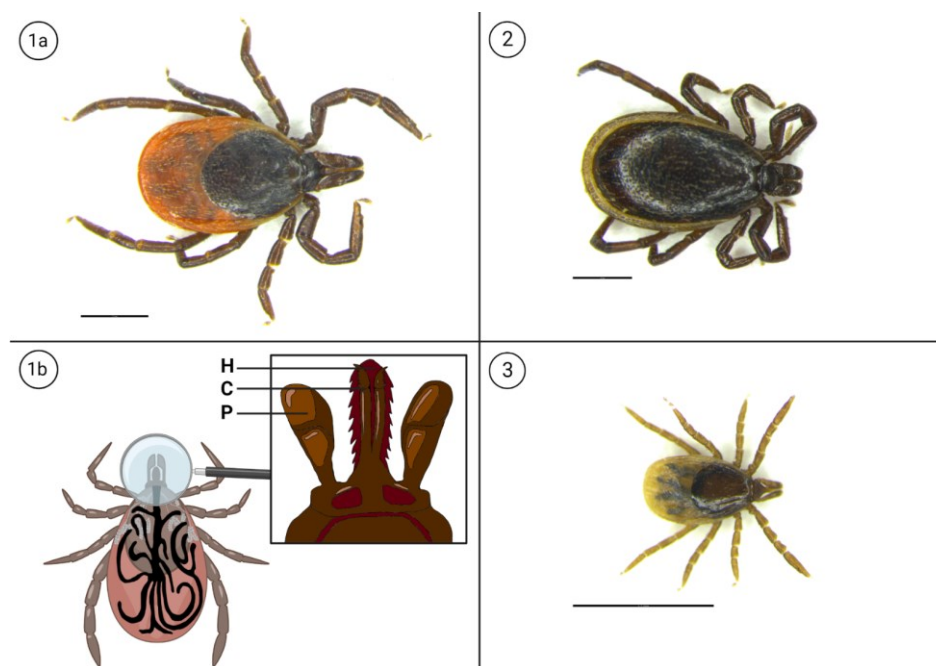


Abbildung 7: *Ixodes-ricinus*-Zecken dargestellt mittels Stereomikroskopie

(1a) Adulte, weibliche *Ixodes-ricinus*-Zecke. Das dunkelbraune, sklerotisierte Schild (*Scutum*) ist dorsal zu erkennen und bedeckt etwa die Hälfte des Rumpfes (*Idiosoma*). Der hellbraun bis rote, nicht-sklerotisierte Abschnitt des *Idiosomas* wird als *Alloscutum* bezeichnet. Schwärzliche durchscheinende Strukturen sind Teile des Zeckendarms.

(1b) Schematische Darstellung der anatomischen Lage der Speicheldrüsen (hellgrau) und des Darms (schwarz) in einer weiblichen Zecke. Vergrößerung: Dorsalansicht des *Capitulum*s einer weiblichen *Ixodes-ricinus*-Zecke mit ihren Mundwerkzeugen, dem *Hypostom* (H), den *Cheliceren* (C) und den *Pedipalpen* (P).

(2) Adulte, männliche *Ixodes-ricinus*-Zecke. Das dunkelbraune *Scutum* bedeckt das gesamte dorsale *Idiosoma*. Die Mundwerkzeuge sind deutlich kürzer ausgeprägt.

(3) *Ixodes-ricinus*-Nymphe. Hier besteht das *Idiosoma* aus dem *Scutum* und dem *Alloscutum* mit durchscheinendem Zeckendarm.

Die Länge des Maßstabs entspricht 1,7 mm.

(1b) Vergrößerung: modifiziert nach RICHTER *et al.* (2013) und STEWART and BLOOM (2020)

Erstellt mit biorender.com

2.2.1.1 Mitteldarm

Das komplette Verdauungssystem der Zecke besteht aus dem präoralen Kanal mit dem Vorderdarm, dem Mitteldarm und dem Hinterdarm. Der Mitteldarm stellt den größten Teil dar und untergliedert sich in den zentralen Magen und in zahlreiche, davon abzweigende Divertikel, die fast die gesamte Körperhöhle der Zecke ausfüllen. Das Darmepithel besteht hauptsächlich aus undifferenzierten Zellen und den digestiven Epithelzellen. Während der Blutmahlzeit entwickeln sich digestive Epithelzellen aus den undifferenzierten Zellen. Die Blutverdauung und die Lyse der Erythrozyten finden teilweise im Darmlumen statt. Die Verdauung des Hämoglobins läuft danach intrazellulär ab. Die schwarze Farbe des Zeckendarms rührt von der Einlagerung des Hämatins aus der Verdauung des Häms (SONENSHINE & ROE, 2014).

Im Laufe der Blutmahlzeit bilden sich eine peritrophische Membran (PM) (ZHU *et al.*, 1991; KARIU *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2021) und ein Dityrosin-Netzwerk (DTN) (YANG *et al.*, 2014) zwischen dem Darmepithel und dem Darmlumen aus. Die PM dient als molekulares Sieb und schützt die Epithelzellen vor abrasiven Inhaltsstoffen, invasiven Mikroorganismen und Toxinen aus der Blutmahlzeit (HEGEDUS *et al.*, 2019). Sie besteht aus Chitin, Glykoproteinen, Glykanen und Peritrophinen (KITSOU *et al.*, 2021). Das DTN reguliert die Homöostase der Darmmikrobiota von Insekten mit einer dualen Oxidase (Duox), die reaktive Sauerstoffspezies produziert (AMEZIANE-EL-HASSANI *et al.*, 2005; DONKÓ *et al.*, 2005). Ähnliches wird bei Spinnentieren und insbesondere bei Zecken vermutet. Denn die Expression der Gene, die für die Biosynthese des Duox-Enzyms kodieren, wurde auch in Zecken nachgewiesen. Sie wird nach der Blutmahlzeit hochreguliert (YANG *et al.*, 2014). Die Anwesenheit und Kolonisierung von pathogenen Bakterien wie *Anaplasma phagocytophilum* und *Borrelia* spp. beeinflussen diese beiden Darmbarrieren. Die Expression der Gene, die für die Bildung des DTN verantwortlich sind, ist in Borrelien-positiven Zecken dreimal so hoch (YANG *et al.*, 2014). Dagegen scheint die Anwesenheit von *A. phagocytophilum* die Expression der Peritrophin-Gene herunterzuregulieren. Folglich wird nur eine sehr dünne PM ausgebildet (ABRAHAM *et al.*, 2017). Dies hat nachweislich Auswirkungen auf die Homöostase des Darmmikrobioms und auf die Persistenz von Borrelien im Darm (ZHU *et al.*, 1991; KARIU *et al.*, 2013).

2.2.1.2 Speicheldrüsen

Die paarig angelegten Speicheldrüsen münden mit ihren Ausführungsgängen in den präoralen Kanal. Sie geben ihre zellulären Bestandteile im Gegenzug zur Aufnahme der Blutmahlzeit ab. Die Speicheldrüsen der Zecken sind als die Organe der Osmoregulation bekannt (BOWMAN & SAUER, 2004) und beherbergen agranuläre und granuläre Acinus-Typen (SONENSHINE & ROE, 2014). Der agranuläre Acinus-Typ 1 sezerniert hygroskopische Lösungen an die Mundwerkzeuge, mit denen die Zecke Feuchtigkeit aus der gesättigten Umgebungsluft aufnehmen kann. Sie reguliert so ihren Wasserhaushalt (KAHL & KNÜLLE, 1988; NEEDHAM & TEEL, 1991). Es gibt drei granuläre Acinus-Typen. Die Größe der Typ 2- und Typ 3-Zellen nimmt während der Blutmahlzeit bis zum 25-Fachen zu. Diese Zellen differenzieren sich und bilden dabei Vakuolen mit wässriger Lösung. Überschüssiges Wasser und Elektrolyte aus der Blutmahlzeit können dadurch wieder abgegeben werden und die Blutmahlzeit kann so konzentrieren werden (SONENSHINE & ROE, 2014). Außerdem sind sie in der Lage, Vorstufen des Zements zu bilden, der in die Stichstelle zur Verankerung des *Hypostoms* sezerniert wird (BINNINGTON, 1978). Nach der Blutmahlzeit degenerieren die Acinus-Typen 2 und 3 und unterliegen einer Reihe von Remodellierungsprozessen (HARRIS & KAUFMAN, 1981; BOWMAN & NUTTALL, 2008). Die Acinus-Typ 4 Zellen werden hauptsächlich in männlichen Zecken vorgefunden (SONENSHINE & ROE, 2014).

Der Speichelfluss wird über neurosekretorische Transmitter und über ein komplexes System an intrazellulären Botenstoffen und Modulatoren reguliert (BOWMAN & NUTTALL, 2008). Zeckenspeichel enthält diverse Proteine (KAZIMIROVA & STIBRANIOVA, 2013; KUROKAWA *et al.*, 2020). Sie wirken z. B. anti-inflammatorisch durch Histamin-bindende Proteine (BROSSARD, 1982; WIKEL, 1982; PAINE *et al.*, 1983) oder inhibieren die Immunantwort im Wirt, indem sie die T-Zellantwort dämpfen (SCHOELER & WIKEL, 2001) oder die Abtötungsfunktion von natürlichen Killerzellen reduzieren (KUBES *et al.*, 2002). Das Speicheldrüsenprotein Salp20 (engl. *salivary protein 20*) zielt z. B. auf die Inhibition des Komplementsystems ab (TYSON *et al.*, 2007).

2.2.2 Lebenszyklus

Ixodes spp. sind obligate Dreiwirt-Zecken (SONENSHINE & ROE, 2014). Sie müssen also im Laufe ihres Lebenszyklus drei Blutmahlzeiten bei entsprechenden Wirten nehmen, um sich weiterzuentwickeln (Abbildung 8). Aus den Eiern schlüpfen Larven. Sie führen ihre erste Blutmahlzeit an einem kleineren Säugetier durch, wie z. B. kleine Nagetiere (RIZZOLI *et al.*, 2014). Die Larve saugt sich voll, fällt vom Wirt ab und sucht unterhalb des Laubs Schutz, wo die Häutung stattfindet. Mithilfe der erhaltenen Nährstoffe und Energie der Blutmahlzeit häutet sich die Larve und entwickelt sich zur Nymphe. Diese besitzt nun ein viertes Beinpaar im Gegensatz zur sechsbeinigen Larve. Die Nymphe sucht normalerweise einen größeren Wirt, wie z. B. Hasen oder Füchse, zur zweiten Blutmahlzeit auf. Dennoch gelangen viele Nymphen bereits in Kontakt mit Hunden, Pferden oder Menschen. Während der zweiten Blutmahlzeit saugen sich die Nymphen voll, fallen vom Wirt ab und entwickeln sich zu adulten, weiblichen oder männlichen Zecken. Adulte Zecken nehmen anschließend eine dritte Blutmahlzeit auf. Dies erfolgt in der Regel an größeren Säugern, wie Rotwild oder weiterem Schalenwild, oder erneut an Hunden, Pferden oder Menschen. Die letzte Blutmahlzeit wird zur Verpaarung benötigt. Adulte, weibliche Zecken legen im Anschluss ihre Eier auf dem Laubboden ab und versterben. Auch für männliche Zecken ist eine dritte Blutmahlzeit für die Reifung der Spermien notwendig. Sie können auf oder abseits des Wirtes die Verpaarung eingehen (SONENSHINE & ROE, 2014).

Der Lebenszyklus einer Zecke dauert ungefähr zwei bis drei Jahre, vorausgesetzt sie findet in der entsprechenden Zeit einen geeigneten Wirt. Falls dies nicht der Fall ist und sie in einer Saison keinen passenden Wirt findet, verlängert sich ihr Lebenszyklus entsprechend bis maximal sechs Jahre (ANDERSON & MAGNARELLI, 2008; MILITZER *et al.*, 2021). Die Dauer der Blutmahlzeit variiert abhängig vom Stadium. Larven und Nymphen saugen im Durchschnitt zweieinhalb bis acht Tage, während adulte Zecken fünf bis zwölf Tage saugen (ANDERSON & MAGNARELLI, 2008). Dieser lange Prozess der Blutaufnahme hängt mit der Notwendigkeit zusammen, dass Zecken während ihrer Blutmahlzeit ständig neue Kutikula bilden müssen, um das Hundertfache ihres Körpergewichts an Blut aufnehmen zu können (ANDERSON & MAGNARELLI, 2008). Zecken haben ihre Aktivitätshöhepunkte im Frühjahr und im Herbst bei geeigneten Wetterbedingungen und befinden sich dann in einer sogenannten aktiven Suchphase. Im Winter befinden sie sich bei kalten Temperaturen in der Ruhephase. Während der Suchphase suchen Zecken nach geeigneten Wirten und können sich horizontal und vertikal entlang der Vegetation bewegen (GRAY, 1985; MEJLON &

JAENSON, 1997). Zecken nehmen ihre Wirte in der Umgebung durch chemosensorische Signale wie Gerüche, Wechsel von Licht zu Schatten und Vibrationen wahr (CROOKS & RANDOLPH, 2006; ANDERSON & MAGNARELLI, 2008). Dabei spielt das Haller Organ, das sich am Ende des vordersten Beinpaars befindet, eine wichtige Rolle. Es kann Kairomone aus der Atemluft des Wirts (Aceton, Ammoniak, Kohlenstoffdioxid (GARCIA, 1962)), während der Schweißsekretion, aus dem Haarkleid und dem Urin registrieren (CARROLL, 1999, 2001; SONENSHINE, 2004). Sobald ein Wirt vorbeistreift, bleiben Zecken am Fell oder an der Kleidung hängen. Für die Stichstelle sucht die Zecke nach dünnen, warmen und gut durchbluteten Hautbereichen (HADDAD *et al.*, 2018). In der Ruhephase ziehen sich Zecken in Areale mit hoher Feuchtigkeit zurück, wenn sie bei passenden Wetterbedingungen keinen Wirt finden konnten (PERRET *et al.*, 2003; ALASMARI & WALL, 2021). Dort sind sie in der Lage, ihre Wasserreserven durch osmotische Vorgänge wieder aufzufüllen. Dieser Vorgang schützt sie vor Austrocknung. Die jahreszeitliche Aktivität der *I.-ricinus*-Zecken ist also stark abhängig vom Klima – hauptsächlich von der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit – und gekennzeichnet durch einen ständigen Wechsel zwischen aktivem Lauern in oberen Vegetationsbereichen und dem Rückzug zu feuchten, niedriger gelegenen Vegetationsbereichen (ESTRADA-PEÑA, 2015).

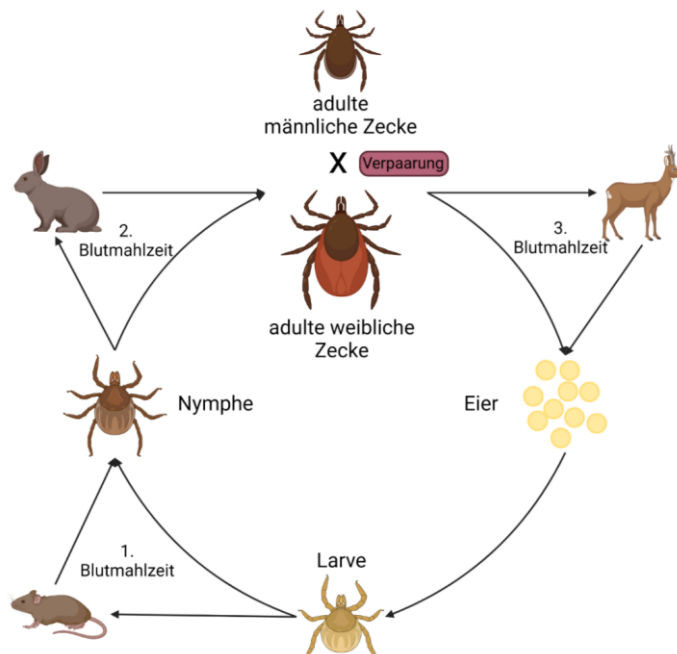


Abbildung 8: Lebenszyklus von *Ixodes-ricinus*-Zecken

Die Larve schlüpft aus den Eiern, die eine adulte, weibliche Zecke zuvor abgelegt hat. Sie sucht einen ersten Wirt auf und beginnt mit der ersten Blutmahlzeit. Danach entwickelt sie sich zur Nympe, die wiederum einen Wirt für die zweite Blutmahlzeit aufsucht. Sie entwickelt sich entweder zu einer männlichen oder weiblichen adulten Zecke. Unabhängig vom Geschlecht suchen adulte Zecken nach geeigneten Wirten für die letzte Blutmahlzeit, um sich zu verpaaren. Modifiziert und übersetzt nach HURRY *et al.* (2021)

Erstellt mit biorender.com

2.2.3 Mechanismus der Blutmahlzeit und der Übertragung von *Bbsl*

Ixodes-ricinus-Zecken scheinen extrem an die Übertragung von Borrelien angepasst zu sein und *vice versa*, wie im Folgenden erläutert wird. Im Laufe ihres Lebenszyklus infizieren sich Zecken mit *Bbsl* (SONENSHINE & ROE, 2014). Während der Blutmahlzeit benutzen Zecken ihre Mundwerkzeuge, um sich an der dünnen Haut des Wirts festzusetzen und diese zu zerschneiden. Die scherenartigen *Cheliceren* reißen die Haut des Wirts auf (RICHTER *et al.*, 2013), sodass sich das mit Widerhaken versehene *Hypostom* in der Stichwunde verankern kann. Dieses wird mit zementähnlichen Substanzen aus dem Zeckenspeichel fixiert (KEMP *et al.*, 1982). Bei der Nahrungsaufnahme wird durch den Saugmechanismus des Rachens (lat. *Pharynx*) Blut in den Nahrungskanal des *Hypostoms* aufgenommen. Im Gegenzug sezernieren Zecken ihren Speichel in den Wirt. Perioden des Blutsaugens wechseln sich mit Perioden des Speichelflusses ab (SONENSHINE & ROE, 2014).

Die Abgabe des Zeckenspeichels in den Wirt bietet Vorteile, wie die Verhinderung der Blutgerinnung, die Verdauung von Wirtsgewebe und die Übertragung von Pathogenen (KEMP *et al.*, 1982). Außerdem geben Speicheldrüsen, simultan zur Aufnahme des Wirtsbluts, das damit aufgenommene, überschüssige Wasser wieder an den Wirt ab. So kann eine maximale Aufnahme an Nährstoffen aus dem Blut gewährleistet werden (TATCHELL *et al.*, 1972). Während des Saugmechanismus kontrahiert sich der *Pharynx*, um die Blutmahlzeit in den Mitteldarm zu transportieren. Die Blutverdauung kann in die Schritte Hämolyse, Hämoglobin und Albumin-Absorption und intrazelluläre Verdauung unterteilt werden. Zwei bis drei Tage nach der Blutmahlzeit beginnt die Defäkation, bei der Hämoglobin, Guanin und andere Nährstoffe ausgeschieden werden (SONENSHINE & ROE, 2014).

Zecken und ihre Wirte beherbergen unterschiedliche Milieus für Borrelien. Zecken sind an die Umgebungstemperaturen angepasst und ihr Mitteldarm besitzt einen basischen pH-Wert zwischen 7,2 bis 7,6 (BALASHOV, 1972). Der Wirtsorganismus reguliert sich allerdings auf stabile Körpertemperaturen von 37 bis 39 °C. Bei der Aufnahme von Blut ändert sich der pH-Wert auf 6,8 bis 6,9 im Mitteldarm der Zecke (YANG *et al.*, 2000; RAMAMOORTHY & SCHOLL-MEEKER, 2001). Borrelien sind in der Lage, sich an diese wechselnden Bedingungen anzupassen, indem die Genexpression ihrer äußeren Oberflächenproteine variieren kann (SCHWAN *et al.*, 1995; SCHWAN & PIESMAN, 2000; YANG *et al.*, 2000).

Das äußere Oberflächenproteine A (OspA, engl. *outer surface protein A*) wird während der Aufnahme der *Bbsl* in den Mitteldarm exprimiert. OspA und OspB erleichtern die Adhärenz und die persistierende Kolonisierung der *Bbsl* an das Epithel des Zeckendarms (YANG *et al.*, 2004). OspA ermöglicht den Borrelien in einer nüchternen Zecke, an TROSPA (engl. *tick receptor for OspA*) zu binden (PAL *et al.*, 2004). TROSPA ist ein Protein, das im Mitteldarm der Zecke exprimiert und während der Blutmahlzeit der Zecke hochreguliert wird (PAL *et al.*, 2000; KENEDY *et al.*, 2012). Es wird für die Kolonisierung der Borrelien im Mitteldarm benötigt (Abbildung 9). Darüber hinaus tragen OspA und OspC durch die Bindung von Plasminogen zum Schutz der Borrelien vor Abwehrmolekülen des neuen Blutzuflusses während einer neuen Blutmahlzeit bei. Plasminogen wird zu Plasmin umgewandelt, das die Bewegung der Borrelien innerhalb der Zecke und des Wirtsgewebes vereinfacht (FUCHS *et al.*, 1994).

Während des Häutungsprozesses der Zecke in ein höheres Entwicklungsstadium verbleiben *Bbsl* im Mitteldarm, bevor sie in das Zielorgan, also in die Speicheldrüsen, migrieren (DE SILVA & FIKRIG, 1995). Borrelien verfügen über wenige Stoffwechselwege und sind daher von ihrem Wirt abhängig (FRASER *et al.*, 1997). Sie konkurrieren mit der Zecke und ihrer Mikrobiota um Nährstoffe. Um diese Nährstoffe von ihrem Wirt abzugreifen, besitzen Borrelien ein Transportsystem (GHERARDINI *et al.*, 2010; CORONA & SCHWARTZ, 2015). Die Spirochäten sind dabei sehr flexibel, denn sie können diese Nährstoffe sowohl von Zecken als auch von Säugetieren beziehen. Als hauptsächliche Kohlenstoffquelle wird Glucose aus dem Blut verstoffwechselt. Im Organismus der Zecken können Glycerol und Chitobiose verwendet werden, um Energie zu gewinnen (FRASER *et al.*, 1997; CORONA & SCHWARTZ, 2015).

Die Anwesenheit von Borrelien verändert nicht nur die Zeckenmikrobiota (NARASIMHAN *et al.*, 2017). Sie scheint auch die Kolonisierung der Borrelien im Mitteldarm zu vereinfachen (NARASIMHAN *et al.*, 2014). In der Anwesenheit von Borrelien wird die Expression des *PIXR*-Gens (engl. *protein of I. scapularis with reeler domain*) hochreguliert (NARASIMHAN *et al.*, 2017; ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2020). Dieses Protein beeinflusst die Kolonisierung mit *Bbsl* positiv und inhibiert die Biofilm-Bildung, was die Anheftung und Migration der Borrelien erleichtert. Eine negative Assoziation zwischen der Abundanz von *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. und Enterobacteriaceae mit *Bbsl* wurde innerhalb des Mikrobioms beschrieben (ROSS *et al.*, 2018; LANDESMAN *et al.*, 2019).

Borrelien erhalten durch die erneute Blutzufuhr in den Mitteldarm und der damit einhergehenden Änderung der Temperatur und des pH-Werts das Signal, vermehrt OspC zu exprimieren. Frühere Studien gingen davon aus, dass gleichzeitig OspA herunterreguliert wird, was zur Migration der Borrelien führt. Heutzutage gibt es Studien, die besagen, dass OspA während des gesamten Prozesses der Blutmahlzeit exprimiert wird (CAIMANO *et al.*, 2019) und es keine wechselseitige Expression gibt. Stattdessen spricht man von einer zusätzlichen Expression von OspC – ausgelöst durch die obengenannten Signale (RAMAMOORTHY & SCHOLL-MEEKER, 2001).

Das System, das die Expression der äußeren Oberflächenproteine OspA und OspC reguliert, ist die alternative Sigma-Faktor-Kaskade RpoN-RpoS (CAIMANO *et al.*, 2019). Dabei fungiert RpoS als Aktivator von Genen, die für die Übertragung und Etablierung der Infektion benötigt werden. RpoS ist jedoch auch in der Lage, die Expression von $\sigma 70$ -abhängigen Zeckengeneten, einschließlich des *ospA*, herunterzuregulieren. Das RpoN-RpoS-System ist während der Blutmahlzeit der Nymphen aktiv, also wenn sich *Bbsl* im Mitteldarm einer nüchternen Zecke akkumulieren (CAIMANO *et al.*, 2011). BosR aktiviert die Rpos-Transkription und damit die Repression von *ospA*, während BadR die Transkription des *rpos*-Gens reprimiert (OUYANG *et al.*, 2011; MILLER *et al.*, 2013). Außerdem ist ein zweiter Signalweg, das Hk1-Rrp1-Zweikomponentensystem (Hybrid-Histidin-Sensorkinase, Diguanylat-Cyclase-Reaktionsregulator), an der Blutmahlzeit der Larven und Nymphen beteiligt (CAIMANO *et al.*, 2011; HARRISON, 2016; KUROKAWA *et al.*, 2020). Hk1 nimmt Moleküle aus der Umgebung des Zeckenstichs, wie Entzündungsmediatoren oder Moleküle des Zeckenspeichels (Katecholamine), wahr (CAIMANO *et al.*, 2011; HARRISON, 2016). Diese überqueren die äußere Spirochäten-Membran und erreichen die periplasmatische D1- und D2-Sensordomäne von Hk1. Folglich wird die Synthese des bakteriellen Botenstoffs c-di-GMP an Rrp1 durch Phosphorylierung aktiviert. Dieser Botenstoff induziert die *ospC*-Expression, die die komplementvermittelte Lyse der Spirochäten hemmen, und fördert das Überleben der Borrelien (CAIMANO *et al.*, 2011; HE *et al.*, 2011; KOSTICK *et al.*, 2011; KUROKAWA *et al.*, 2020). Schließlich führt die Expression von *ospC* zur Migration der Borrelien durch die Hämolymphe in die Speicheldrüsen (Abbildung 9). Dort können sie im Verlauf der nächsten Blutmahlzeit an den Wirt übertragen werden. Das Speichelprotein Salp15 bindet dabei an OspC und trägt dazu bei, die Immunantwort des Wirts zu unterdrücken. Salp15 hemmt die Aktivierung von T-Zellen und verhindert die Antikörper-vermittelte

Abtötung von Borrelien im Wirt (HARRISON, 2016).

Aufgrund dieser komplexen Migration durch die Zecke werden *Bbsl* je nach Literatur erst nach etwa 24 bis 48 Stunden übertragen (COOK, 2014). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass manche Genospezies schneller übertragen werden können (SERTOUR *et al.*, 2018). Außerdem steigt das Risiko der Übertragung von Pathogenen bereits nach zwölf Stunden (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2014). Es ist schwierig, eine Mindestanhaftungszeit der Zecke für die Übertragung der Borrelien anzugeben (COOK, 2014), da Zecken nicht immer nur an einem Wirt eine vollständige Blutmahlzeit durchführen und sich teilweise neu anheften. Für den neuen Wirt kann sich die Übertragungszeit der Borrelien auf unter 24 Stunden verkürzen (SHIH & SPIELMAN, 1993).

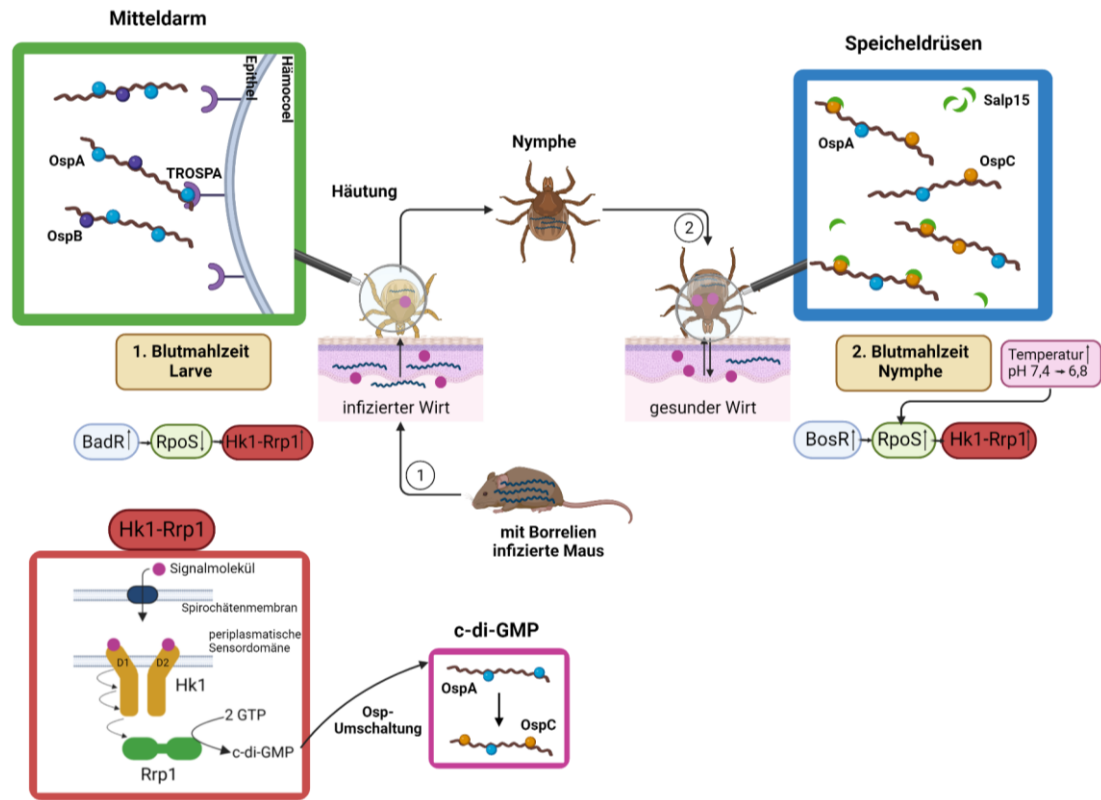


Abbildung 9: Mechanismus der Borrelien-Übertragung (*Bbsl*)

Übertragung der Borrelien auf die Zecke (1):

Die erste Blutmahlzeit einer Zeckenlarve erfolgt beispielhaft direkt an einem mit *Bbsl* infizierten Wirt (z. B. Feldmaus). Die Expression von *badr* (*Borrelia* host adaption regulator) führt zu einer Reprimierung der Sigmafaktorkaskade RpoS-RpoN. Gleichzeitig ist das Hk1-Rrp1 System aktiv und steuert Gene, die das Überleben der *Bbsl* im Darm der Zecke ermöglichen. Durch blutmahlzeitspezifische Signalmoleküle wird das System aktiv. Diese Moleküle binden an die periplasmatische D1-D2-Sensordomäne nach Passieren der äußeren Spirochäten-Membran. Dabei wird ein *second messenger* frei, c-di-GMP, welcher zur Umschaltung der Expression äußerer Oberflächenproteine (von OpsA zu OspC) führt. Im Mitteldarm der Larve akkumulieren Borrelien, die mit ihrem OspA an den TROSPA-Rezeptor der Epithelzellen des Mitteldarms binden können.

Übertragung der Borrelien auf den Wirt (2):

Nach der ersten Blutmahlzeit der Larve erfolgt die Häutung zur Nymphe, die eine zweite Blutmahlzeit ausführt. Währenddessen wird *bosr* exprimiert, was zur Aktivierung des Sigmafaktorkaskaden-Systems RopS-RpoN führt. Es steuert Gene, die für die physiologischen Anpassungen an die Blutmahlzeit, für die chemotaktische Migration aus dem Darm und für den Übergang der *Bbsl* in eine infektiöse Form kodieren. Dabei wird OspA und OspB herunterreguliert. Gleichzeitig wird die Genexpression des äußeren Oberflächenproteins OspC hochreguliert. Das Hk1-Rrp1-System ist auch während der zweiten Blutmahlzeit aktiv. Borrelien migrieren nun durch das *Hämocoel* zum Zielorgan der Speicheldrüsen. Hier bindet ein Speicheldrüsenprotein Salp15 an das OspC, das *Bbsl* bei der Übertragung vor dem Immunsystem des Wirtsorganismus schützt. Salp15 schützt vor T-Zell Aktivierung und vor der antikörpervermittelten Immunabwehr.

Modifiziert und übersetzt nach CAIMANO *et al.* (2011), HARRISON (2016) und KUROKAWA *et al.* (2020)

Erstellt mit biorender.com

2.3 Zeckenübertragene Infektionen

2.3.1 *Anaplasma phagocytophilum* und Infektion

Der natürliche Infektionszyklus von *Anaplasma phagocytophilum* ist abhängig von dem Vorkommen infizierter Reservoirre. Zu ihnen gehören Cervidae (Rotwild, Rehwild, Weißwedelhirsche), Eidechsen, Vögel und Zecken wie *Ixodes ricinus*, die als Vektor dienen (ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2015). In Deutschland tragen etwa 1,6 bis 17,4 % der *Ixodes-ricinus*-Zecken *A. phagocytophilum* in sich (FINGERLE *et al.*, 1999; SILAGHI *et al.*, 2012). Erkrankungen, wie die humane granulozytäre Anaplasrose, die equine und die canine Anaplasrose und das Weidefieber bei Wiederkäuern, sind Folgen einer Infektion mit *A. phagocytophilum* (BAKKEN & DUMLER, 2015; SEVERO *et al.*, 2015). Das klinische Bild gleicht einer Grippe mit undifferenziertem Fieber (BAKKEN & DUMLER, 2015). Die Mitteldarmzellen der Zecken infizieren sich zunächst während der Blutmahlzeit. Später besiedelt *A. phagocytophilum* die Speicheldrüsen und kann von dort an weitere Wirte übertragen werden (TELFORD III *et al.*, 1996). Viele Speicheldrüsenproteine, insbesondere Salp16, fördern die Übertragung von *A. phagocytophilum* (SUKUMARAN *et al.*, 2006; FOLEY & NIETO, 2007; LIU *et al.*, 2011). Wie der Name vermuten lässt, besitzt *A. phagocytophilum* eine Präferenz für phagozytäre Zellen (STUEN *et al.*, 2013). Sie infizieren hauptsächlich neutrophile Granulozyten im Wirtsorganismus (AYLLÓN *et al.*, 2015; SEVERO *et al.*, 2015) und sind in der Lage, intrazellulär in neutrophilen Granulozyten zu überleben. Sie können sich dort in Vakuolen im Zytoplasma replizieren (MUNDERLOH *et al.*, 1999; CHOI *et al.*, 2005) und sammeln sich in sogenannten *Morulae* (POPOV *et al.*, 1998; NGUYEN TRONG *et al.*, 2019). Dabei werden zwei morphologisch unterschiedliche Formen beobachtet: kleinere elektronendichte Zellen (DC), die ein dichtes Nukleoid aufweisen, und größere elektronendurchlässige, netzartige Zellen (RC), die ein verstreutes Nukleoid aufweisen (TROESE & CARLYON, 2009). Eine dünne äußere Membran, die keine Anzeichen einer Peptidoglykanschicht oder von Lipopolysacchariden aufweist, umhüllt Anaplasmen (RIKIHISA *et al.*, 1997; NGUYEN TRONG *et al.*, 2019).

Bei der Blutmahlzeit von Zecken am Wirt wird in der Nähe der Stichstelle eine neutrophil-assoziierte Immunantwort durch zahlreiche Zeckenspeichelproteine hervorgerufen (BEAUFAYS *et al.*, 2008; GUO *et al.*, 2009; HEINZE *et al.*, 2012). Es ist allerdings fraglich, ob diese Zellen aufgrund ihrer Kurzlebigkeit im weiteren Infektionsverlauf oder für die Persistenz eine Rolle spielen (HERRON *et al.*, 2005). Bisher ist wenig bekannt über alternative Zellen (GRANICK *et al.*, 2008). Um die

Infektion aufrecht zu erhalten, nutzen Anaplasmen einige Strategien, wie die Inhibierung der Apoptose, die Manipulation des Immunsystems und die Umstrukturierung des Cytoskeletts (IRETON, 2013). Zecken, die mit *A. phagocytophilum* infiziert sind, exprimieren das *iafgp*-Gen. Dieses Gen kodiert für das AntiFreeze-Glykoprotein. Infizierte Zecken produzieren damit ihr eigenes Kälteschutzmittel, was ihr Überleben bei kalten Bedingungen über die Winterperiode sichert (NEELAKANTA *et al.*, 2010). Das beschreibt eine einzigartige Symbiose zwischen einem humanpathogenen Bakterium und Zecken als Vektor.

2.3.2 *Borrelia* spp. und Infektion

Die Gattung *Borrelia* lässt sich in die Familie der Borreliaceae, in die Ordnung der Spirochaetales und in den Stamm der Spirochaetota einordnen (MARGOS *et al.*, 2018; OREN & GARRITY, 2021). Borrelien wurden nach dem französischen Mediziner und Bakteriologen Amédée Borrel (1867 – 1936) benannt (HUNFELD, 2020). Sie können in der freien Umwelt nicht überleben und sind somit wirts-assoziiert (HARRISON, 2016). Arthropoden, in der Regel Zecken (mit Ausnahme der Laus), dienen als Vektor zur Übertragung der Borrelien aus ihrem natürlichen Habitat auf einen Wirt (PIESMAN & GERN, 2004). Borrelien besitzen die Fähigkeit, der Immunantwort des Wirtes zu entgehen, indem sie z. B. ihre Oberflächenproteine schnell variieren können (HÜBNER *et al.*, 2001) oder ihre äußere schraubenförmige Gestalt verändern. Einige Genospezies wie *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (*Bbss*), *Borrelia afzelii* oder *Borrelia garinii* sind für Menschen und Tiere pathogen. Sie lösen die Lyme-Borreliose (*Borrelia-burgdorferi-sensu-lato*-Komplex) oder das Rückfallfieber (z. B. *B. miyamotoi*) aus (STEERE *et al.*, 2016; LOPEZ *et al.*, 2021). Die verschiedenen Genospezies des *B.-burgdorferi-sensu-lato*-(*Bbsl*)-Komplexes lösen unterschiedliche Ausprägungen der klinischen Veränderungen aus (Tabelle 1). *Bbss* ist hauptsächlich gelenksassoziiert, *B. afzelii* ist primär hautassoziiert und *B. garinii* tendenziell neurotroph (STEERE, 2001).

Diese Spirochäten sind pleomorph, das heißt, sie können ihre Morphologie als Reaktion auf die Umweltbedingungen verändern (MERILÄINEN *et al.*, 2016). Pleomorphismus wird üblicherweise *in vitro* mit Verbindungen induziert, die entweder die Zellwand lysieren (lytische Enzyme) oder die Zellwandsynthese stören, wie etwa Antibiotika (BRIERS *et al.*, 2012). Diese Behandlung führt in der Regel zu einem vollständigen oder teilweisen Verlust der Peptidoglykan-Zellwand. Die daraus resultierenden Zellen werden als zellwand-defizient (engl. *cell wall-deficient*, CWD), L-Formen oder

Rundkörper (engl. *round bodies*, RB) bezeichnet (RANJIT & YOUNG, 2013; ERRINGTON *et al.*, 2016). Die *Bbss*-RB zeigen eine reduzierte Stoffwechselrate (MERILÄINEN *et al.*, 2015). Allerdings sind die Bestandteile der Zellhülle und die detaillierte Morphologie von *Bbss*-RB bisher nicht eindeutig untersucht worden. Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass Pleomorphismus dem Bakterium im Allgemeinen dabei helfen kann, das Immunsystem zu umgehen oder die Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika zu verringern sowie seine pathogenen Mechanismen zu verändern (DOMINGUE & WOODY, 1997; JUSTICE *et al.*, 2008). Die Bildung von Biofilm-ähnlichen Kolonien wird bei Borrelien diskutiert (MERILÄINEN *et al.*, 2015).

Tabelle 1: *Borrelia-burgdorferi*-sensu-lato-Komplex in *I. ricinus*-Zecken

Genospezies	Geographisches Vorkommen	Vektor	Reservoirwirt
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto	Nordamerika, Europa	<i>I. scapularis</i> , <i>I. pacificus</i> , <i>I. neotomae</i> , <i>I. ricinus</i>	Nager, kleine Säuger, Vögel, Wild, größere Säuger
<i>Borrelia garinii</i> subsp. <i>garinii</i> , <i>Borrelia garinii</i> subsp. <i>bavariensis</i>	Europa, Asien	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	Vögel, kleine Säuger
<i>Borrelia afzelii</i>	Europa, Asien	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	Kleine Säuger
<i>Borrelia valaisiana</i>	Europa, Asien	<i>I. ricinus</i>	Vögel
<i>Borrelia spielmanii</i>	Deutschland, Slowenien	<i>I. ricinus</i>	Vögel?
<i>Borrelia lusitaniae</i>	Europa, Nordamerika	<i>I. ricinus</i>	Nager, Eidechsen

Übersetzt und modifiziert nach LITTMAN *et al.* (2023)

2.3.2.1 Lyme-Borreliose

In Old Lyme, einer Kleinstadt in Connecticut, USA, traten im Jahr 1977 gehäufte Arthritiden bei Jugendlichen und Kindern auf (HUNFELD, 2020). Diese wurden von dem Humanmediziner Alen Steere dokumentiert (STEERE *et al.*, 1978). Später wurde diese Lyme-Arthritis in Zusammenhang mit Zeckenstichen von *Ixodes scapularis* gebracht. Im Jahre 1982 isolierte der Schweizer Willy Burgdorfer diese neue Borrelienart und wurde mit *Borrelia burgdorferi* nach ihm benannt (BURGDORFER *et al.*, 1982). Heute wird sie genauer als *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (*Bbss*) bezeichnet. Sie gilt nach wie vor als die wichtigste Borrelienart in Nordamerika. In

Europa kommen zusätzlich *B. garinii* und *B. afzelii* als Hauptvertreter des *Bbsl*-Komplexes vor (BARANTON *et al.*, 1992).

Die Lyme-Borreliose wird als eine vektorgebundene Naturherdinfektion bezeichnet, dessen Erreger in freilebenden Nagern, Säugetieren und Vögeln oder Eidechsen persistieren (Tabelle 1). Sie kommt nur auf der Nordhalbkugel vor. In unmittelbarer Nähe zur Stichstelle entwickelt sich in vielen Fällen (ca. 80 %) eine Hautläsion, die sogenannte Wanderröte, lateinisch auch *Erythema migrans* (STEERE *et al.*, 2016). In Stadium II folgt in Europa meist die Lyme-Neuroborreliose mit einer lymphozytären Meningitis, einer kranialen Neuritis oder Radikulopathie (PACHNER & STEERE, 1985). Eine akute Herzbeteiligung kann auftreten (STANEK *et al.*, 1990). In Europa äußert sich die späte Manifestation der Infektion (Stadium III) in der Entwicklung einer *Acrodermatitis chronica atrophicans* oder seltener in einer chronische Enzephalomyelitis (ASBRINK *et al.*, 1986; OSCHMANN *et al.*, 1998; MULLEGER, 2004). In Nordamerika ist die Lyme-Arthritis typisch für das Stadium III (STEERE *et al.*, 1987).

Für den Verlauf der Lyme-Borreliose ist es essentiell, die Infektion frühzeitig zu erkennen und die Therapie mit einer Antibiose, abhängig vom Stadium der Erkrankung, so schnell wie möglich zu beginnen (KULLBERG *et al.*, 2020). In manchen Fällen ist eine vollständige Eliminierung der Borrelien aufgrund ihrer Immunevasion jedoch schwierig (KARVONEN *et al.*, 2021).

2.3.2.2 Rückfallfieber

Neben dem *Bbsl*-Komplex gibt es weitere Borrelien-Genospezies, die der Rückfallfieber-Gruppe zugeordnet werden. Diese werden hauptsächlich durch die Kleiderlaus (*Pediculus humanus*) übertragen (*B. recurrentis*) (FELSENFELD, 1971). Das sogenannte Läuserückfallfieber tritt gehäuft zu Bedingungen, wie kälteren Temperaturen oder mangelnder Körperhygiene, auf (LOPEZ *et al.*, 2021).

Des Weiteren können sie aber auch durch Lederzecken (*Ornithodoros* spp.) oder Schildzecken (*Ixodes* spp.) übertragen werden (z. B. *B. miyamotoi*). Man spricht dann vom Zeckenrückfallfieber. Klinische Symptome sind typischerweise periodenartige Fieberschübe, die sich mit Zeitabschnitten abwechseln, in denen der Patient kaum Symptome zeigt. Erkrankte Patienten leiden an abdominalen, Kopf-, Rücken- und Muskelschmerzen, allgemeiner Schwäche und Gewichtsverlust (GOODMAN *et al.*, 1969; LOPEZ *et al.*, 2021).

2.3.3 *Rickettsia* spp. und Infektion

Es gibt durch Zecken, durch Flöhe und durch Läuse übertragene Rickettsien, die Erkrankungen, die sogenannten Rickettsiosen, hervorrufen. Die bekannteste, europäische, durch Zecken übertragene Rickettsiose ist das Mittelmeerfleckfieber (MSF), das durch die braune Hundezecke (*Rhipicephalus sanguineus*) übertragen wird und von *Rickettsia conorii* ausgeht (GILOT *et al.*, 1990; OTEO *et al.*, 1996). Diese Infektion wird hauptsächlich im Sommer (Juli bis September) beobachtet (BORAWSKI *et al.*, 2019). Außerdem gewinnt die Infektion mit *Rickettsia helvetica* – übertragen durch *I. ricinus* – immer mehr an Bedeutung. Sie wird als humanpathogen diskutiert, da eine Infektion meist mild und selbst limitierend verläuft (BORAWSKI *et al.*, 2019). Dennoch liegen mehrere Fallberichte, in denen unspezifische, fieberhafte Symptome geschildert wurden (NILSSON *et al.*, 1999; FOURNIER *et al.*, 2000; FOURNIER *et al.*, 2004), und vereinzelt Fallberichte, in denen die Entwicklung einer Karditis oder Meningitis beschrieben wird, vor (NILSSON *et al.*, 1999; NILSSON *et al.*, 2010). Vor allem südliche Länder, wie Spanien, Portugal und Italien sind davon betroffen. Durch den Klimawandel und den Vogelzug sind Rickettsiosen neuerdings in nördlicheren, europäischen Gebieten präsent (WALLMÉNIUS *et al.*, 2014).

Rickettsiosen der Fleckfiebergruppe rufen ein unspezifisches klinisches Bild hervor, das von plötzlichem Fieber, Kopfschmerz, Muskel- und Gelenksbeschwerden und von einem (maculo-)papulösem Ausschlag gekennzeichnet ist. Ein deutliches Anzeichen des MSF ist oftmals eine nekrotische Läsion (franz. *tache noire*), die sich auf der Stelle des Zeckenstichs bildet. Die Inkubationszeit beträgt zwischen drei und zwölf Tage nach dem Zeckenstich (BIGGS *et al.*, 2016).

3 Das Zeckenmikrobiom

Es bleibt nach wie vor eine schwierige Angelegenheit, Zecken und vor allem die in ihnen vorkommenden Infektionserreger effektiv zu bekämpfen. Bisher gibt es für den Menschen nur zugelassene Impfstoffe, die gegen *einen* Infektionserreger (wie z. B. gegen das FSME-Virus) schützen (KUBINSKI *et al.*, 2020). Die Entwicklung von Antigen-basierten Zeckenimpfstoffen auf Grundlage von Zeckenproteinen war seit der Entdeckung von potentiellen Kandidaten erfolglos (ALMAZÁN *et al.*, 2020; TRENTELMAN *et al.*, 2021). Auch kombinierte Antigen-basierte Zeckenimpfstoffe erzielten eine unzureichende Wirkung in Tierversuchen (SAJID *et al.*, 2021). Zecken saugen zwar kürzer und fallen schneller vom Wirtstier ab (DE LA FUENTE *et al.*, 2006). Allerdings konnten diese Impfstoffkandidaten keinen vollständigen Schutz vor einem Stich und der Übertragung von Bakterien gewährleisten.

Einen neuen, ganzheitlichen Ansatz stellen die Anti-Mikrobiota Impfstoffe dar (WU-CHUANG *et al.*, 2022). Hier wird nicht das potentiell pathogene Bakterium *per se*, sondern die Zecke mit ihrem gesamten Mikrobiom – bestehend aus Symbionten und kommensalen Bakterien als eine ökologische Einheit – in den Mittelpunkt gerückt. Eine Manipulation dieser ökologischen Einheit, wie z. B. mit einer Antibiotikabehandlung, wirkt sich auf diese Homöostase aus. Eine Immunisierung gegen Schlüsselmitglieder des Zeckenmikrobioms könnte durch Wirtsantikörper eine mikrobielle Dysbiose auslösen (WU-CHUANG *et al.*, 2022). Diese Idee stammt aus der Forschung an durch Mosquitos übertragenen Infektionen. Durch Modulation des Vektormikrobioms konnte man erfolgreich die Übertragung von Malaria, Denguefieber und anderen durch Mosquitos übertragenen Krankheiten reduzieren (VAN TOL & DIMOPOULOS, 2016).

Eine Manipulation des Mikrobioms und eine damit einhergehende Dysbiose könnte ebenfalls Folgen für die Zeckenphysiologie und Vektorkompetenz verursachen. Als Schlüsselmitglieder stehen vor allem die Endosymbionten der Zecken im Fokus (SASSERA *et al.*, 2006; BUDACHETRI *et al.*, 2018). Ein verringertes Vorkommen essentieller Bakterien verschiebt die Homöostase in der Hoffnung, dass potentiell pathogene Bakterien kaum mehr übertragen werden können (WU-CHUANG *et al.*, 2022). Als Beispiel dient die oben beschriebene peritrophische Matrix (PM). Veränderungen der Mikrobiota scheinen die Integrität der PM zu unterbrechen (HEGEDUS *et al.*, 2009; NARASIMHAN *et al.*, 2017). Sie dient als Barriere zwischen dem einströmenden Blut einer Blutmahlzeit und dem Darmepithel der Zecke. Eine

Disruption der Matrix führt zu einer schlechteren Anheftung und Kolonisierung von Borrelien im Zeckendarm. Eine detaillierte Erforschung des Zeckenmikrobioms und deren Manipulation ist ein vielversprechender Ansatz, um zeckenübertragene Krankheiten zu verringern (BONNET & POLLET, 2021).

3.1 Potentielle Endosymbionten im Zeckenmikrobiom

Für *Ixodes*-spp.-Zecken sind mehrere Endosymbionten beschrieben, darunter *Arsenophonus nasoniae*, *Coxiella*-ähnliche Endosymbionten (CLE), *Francisella*-ähnliche Endosymbionten (FLE), *Rickettsiella* spp., *Spiroplasma* spp., *Wolbachia* spp. und *Candidatus* *Midichloria mitochondrii* (HUNTER *et al.*, 2015; HODOSI *et al.*, 2022).

Ein weltweiter Klassiker unter den endosymbiontischen Bakterien sind *Wolbachia* spp., denn sie gelten als die am häufigsten vorkommenden Endosymbionten der Erde (LANDMANN, 2019). HERTIG and WOLBACH (1924) entdeckten sie zuerst in der Stechmücke *Culex pipiens*. Die Symbiose besteht darin, dass *Wolbachia* spp. auf ihren Wirt angewiesen sind, um Nährstoffe wie Aminosäuren und Lipide zu erhalten, da ihnen Gene für die Stoffwechselwege fehlen. Im Gegenzug stellen *Wolbachia* spp. biosynthetische Wege zur Verfügung, um Cofaktoren wie Vitamine, Purine und Häm zu produzieren (WU *et al.*, 2004; FOSTER *et al.*, 2005). Auf Grundlage dieser nachgewiesenen Symbiose wurden *Wolbachia* spp. bereits als Ziel zur Bekämpfung von Krankheiten wie der Filariose (z. B. Flussblindheit oder Elefantiasis) eingesetzt (WAN SULAIMAN *et al.*, 2019). Die Behandlungen gegen Nematoden werden in der Regel mit einem klassischen Anthelminthikum durchgeführt. In diesem Fall kann eine anthelminthische Behandlung nur die adulten Nematodenwürmer im Wirt sterilisieren und ist daher nicht vollständig erfolgreich. Eine zusätzliche antibiotische Behandlung gegen *Wolbachia* spp. tötet die adulten Würmer nachhaltig ab und verhindert die Larvenentwicklung (WAN SULAIMAN *et al.*, 2019). Die Eliminierung der Nematoden kann also entweder über Antibiotika erfolgen (HOERAUF *et al.*, 2000; HOERAUF *et al.*, 2009) oder indem in die Häm-Biosynthese von *Wolbachia* spp. eingegriffen wird (LENTZ *et al.*, 2013). Nur die kombinierte Behandlung der Nematoden und ihrer Endosymbionten führt zu einer erfolgreichen Genesung der Wirte. Ähnliche Prozesse werden in der Biologie der Zecken in Betracht gezogen – vermutlich nicht für *Wolbachia* spp., aber möglicherweise für *Cand. Midichloria mitochondrii*, da sie in deutlich höheren Abundanzen als andere Bakterien in der Zecke vorkommen.

In neueren Veröffentlichungen über das Zeckenmikrobiom werden *Wolbachia* spp. immer häufiger in *Ixodes-ricinus*-Zecken gefunden (HARTELT *et al.*, 2004; CARPI *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2011). Sie kommen in der Regel nur sehr selten vor (PLANTARD *et al.*, 2012). Natürliche Populationen von *Ixodiphagus hookeri* – der endoparasitischen Wespe von *I. ricinus* – sind mit einer Prävalenz von nahezu 100 % mit *Wolbachia pipientis* infiziert. Alle Zecken, in denen *Wolbachia* spp. nachgewiesen werden konnte, wurden auch von *I. hookeri* parasitiert, während nichtparasitierte Zecken überwiegend frei von *Wolbachia* spp. waren (PLANTARD *et al.*, 2012). Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass das Vorhandensein von *Wolbachia* spp. in Zecken mit dem Parasitismus von *I. hookeri* einhergeht. Die Auswirkungen von *Wolbachia* spp. auf das Mikrobiom von *I. ricinus* scheinen aus diesem Grund sekundär zu sein, da sie kein Teil des "echten" Zeckenmikrobioms sind (PLANTARD *et al.*, 2012; GREAY *et al.*, 2018; HODOSI *et al.*, 2022). Ein weiterer Grund dafür könnte ihre geringe relative Häufigkeit in Zecken sein (WIESINGER *et al.*, 2023). Dennoch wäre es denkbar, dass *Wolbachia* spp. andere Bakterien im Mikrobiom der Zecken beeinflussen könnten. Eine negative Wechselwirkung zwischen einigen Krankheitserregern wie *Bbss*, *Babesia microti* und *I. hookeri* wurde in *I.-scapularis*-Zeckenpopulationen in Nordamerika festgestellt (MATHER *et al.*, 1987). Die Prävalenz potentieller Krankheitserreger war in mit Wespen befallenen Sammelstellen um 40 % niedriger als in wespenfreien Sammelstellen. MATHER *et al.* (1987) vermuteten, dass *I. hookeri* die Zecke zu einem weniger geeigneten Wirt für Krankheitserreger machen könnte. Der Endoparasitismus der Wespe könnte eine Immunreaktion auslösen, die sich negativ auf andere von Zecken beherbergten Mikroorganismen auswirken könnte (HAINE, 2008). Im Gegensatz dazu fanden SKINNER *et al.* (2022) eine erhöhte Replikation von *A. phagocytophilum* in *Wolbachia*-spp.-infizierten ISE6-Zellen. Eine stabile kulturelle Infektion mit *Wolbachia* spp. ist jedoch schwierig, da die Bakteriendichte nach der Passage abnimmt.

Candidatus *Midichloria mitochondrii*, früher IricES1 (*I. ricinus* Endosymbiont 1), gehört zur Ordnung der Rickettsien und hat die besondere Fähigkeit, die Mitochondrien von *Ixodes-ricinus*-Zeckenzellen zu kolonisieren (EPIS *et al.*, 2013) und sich im mitochondrialen Zwischenmembranraum aufzuhalten (SASSERA *et al.*, 2006; STAVRU *et al.*, 2020). Der Symbiont hat einen großen Einfluss auf die Fitness und Physiologie der weiblichen Zecken (OLIVIERI *et al.*, 2019). Darüber hinaus ist *Candidatus* *M. mitochondrii* ein wesentlicher Bestandteil der mikrobiellen

Gemeinschaft der Zecke mit teilweise sehr hohen Abundanzen (WIESINGER *et al.*, 2023). Es gibt Hinweise darauf, dass er sogar eine Rolle bei der Übertragung von durch Zecken übertragenen Krankheitserregern spielt (SASSERA *et al.*, 2006). Detaillierte Untersuchungen zur Bestätigung einer endosymbiontischen Interaktion fehlten jedoch bisher. Laborexperimente zeigten, dass *I. ricinus* *Cand. M.* mitochondrii während der langen Haltung im Labor verliert (LO *et al.*, 2006; NAJM *et al.*, 2012), vermutlich da sie ständig einer regulierten Raumtemperatur und stabilen Bedingungen ausgesetzt sind (WEEKS *et al.*, 2002). Die Autoren gehen daher davon aus, dass *Cand. M.* mitochondrii vor allem dann benötigt wird, wenn kalte, widrige Bedingungen herrschen. Es ist nach wie vor schwierig, die natürlichen Feldbedingungen für Zeckenpopulationen im Labor zu imitieren, da sie im Freien kühle Bedingungen und Temperaturen unter dem Gefrierpunkt überleben (LO *et al.*, 2006). *Cand. M.* mitochondrii und sein Genom heben sich insofern in ihrer Ordnung ab, als dass sie Gene enthalten, die in anderen Rickettsiales bisher nicht gefunden wurden (HODOSI *et al.*, 2022). Es enthält eine Cytochrom-c-Oxidase vom Typ *cbb3*, die als eine Häm-Kupfer-Protonenpumpen-Oxidase charakterisiert wird (SASSERA *et al.*, 2011). Dieses Enzym ist in der Lage, seine Phosphorylierung auch bei einem niedrigen Sauerstoffgehalt durchzuführen und kann unter mikroaeroben Bedingungen und unter Verwendung von ATP aktiv sein. Außerdem kann *Cand. M.* mitochondrii B-Vitamine synthetisieren, insbesondere Vitamin B9 (Folat) und B7 (Biotin) (HUSSAIN *et al.*, 2022). Dies ist für die Zecke von entscheidender Bedeutung, da diese Vitamine nicht über die Blutmahlzeiten aufgenommen werden und Zecken nicht in der Lage sind, sie selbst zu synthetisieren (SASSERA *et al.*, 2011). Vitamin B spielt eine wesentliche Rolle bei der Blutverdauung, dem Überleben und der Fortpflanzung der Zecke (HODOSI *et al.*, 2022).

Arsenophonus nasoniae wird als ein Symbiont beschrieben (NADAL-JIMENEZ *et al.*, 2019), der den Tod männlicher Nachkommen der parasitoiden Wespe *Nasonia vitripennis* verursacht. Diese Wespe ist ein Parasit des Puppenstadiums verschiedener Fliegenarten. Der griechischer Name des Bakteriums kann mit "Männchen-Töter" übersetzt werden (GHERNA *et al.*, 1991). Das Phänomen der Männchen abtötenden Bakterien kann die Fitness aller verbleibenden (weiblichen) Brutmitglieder erhöhen, die aufgrund der Erregerübertragung evolutionär gesehen wichtiger sind (RANDERSON *et al.*, 2000). Bei Zecken sind hauptsächlich Nymphen mit *A. nasoniae* infiziert, was auf eine Abhängigkeit von dem Entwicklungsstadium schließen lässt (SUBRAMANIAN *et al.*, 2012). Es gibt keine eindeutigen Daten darüber, welche Auswirkungen *A. nasoniae* auf das Zeckenmikrobiom hat oder ob der Abtötungsprozess von Männchen auch bei Zecken funktioniert. Der Nachweis von *A. nasoniae* im Mikrobiom der Zecken könnte – ähnlich wie bei *Wolbachia* spp. – nichts mit dem "echten" Zeckenmikrobiom zu tun haben (HODOSI *et al.*, 2022), da die Wespe *Nasonia vitripennis* in Vogelnestern brütet und Vögel ebenfalls als Wirte für Zecken dienen. *A. nasoniae* wurde auch in der Zeckenwespe *Ixodiphagus hookeri* nachgewiesen (BOHACSOVA *et al.*, 2016), was *A. nasoniae* als direkten, potenziellen Endosymbionten infrage stellt.

Die Familie Coxiellaceae umfasst zwei Gattungen: *Rickettsiella* spp. und *Coxiella* spp. mit *C. burnetii* als einzige Art und als Verursacher des Q-Fiebers (SHAW & VOTH, 2019). Im Rahmen des sylvatischen Zyklus gelten Zecken als natürliche Reservoir für *C. burnetii* (CELINA & CERNÝ, 2022). Die direkte Übertragung auf den Menschen durch einen Zeckenstich ist jedoch kaum untersucht. *Coxiella*-ähnliche Endosymbionten (CLE) sind den *C.-burnetii*-Stämmen genetisch nahe (BRENNER *et al.*, 2021), konnten aber bisher nicht isoliert werden. Studien zeigen eine relativ geringe Prävalenz von 12 % bei weiblichen, adulten Zecken (HODOSI *et al.*, 2022). Sowohl CLE als auch *Cand. M. mitochondrii* versorgen die Zecke vermutlich mit B-Vitaminen und fördern vermutlich die Zeckenbiologie (GOTTLIEB *et al.*, 2015; GUIZZO *et al.*, 2017). Sie sind nicht mit einem bestimmten Zeckengewebe assoziiert, kommen aber hauptsächlich in den Malpighischen Tubuli und den Ovarien vor, was ein Vorteil für die Fortpflanzung sein könnte (HODOSI *et al.*, 2022).

Rickettsiella spp. sind phylogenetisch näher an *Legionella* spp. und *Coxiella* spp. als an *Rickettsiae* spp. (HODOSI *et al.*, 2022). Diese intrazellulären Bakterien werden entweder als pathogen für die Entwicklung und Reproduktion ihrer Wirte beschrieben (ROSENWALD *et al.*, 2020) oder sogar als wichtig für das Überleben der Wirte, da sie B-Vitamine synthetisieren können (PRICE *et al.*, 2021). Die biologische Rolle von *Rickettsiella* spp. ist nach wie vor unklar. In Zecken werden *Rickettsiella* spp. in allen aktiven Entwicklungsstadien und an allen untersuchten Sammelstellen nachgewiesen. Die Prävalenz war jedoch je nach Ort und Entwicklungsstadium unterschiedlich (GARCIA-VOZMEDIANO *et al.*, 2022). Es wird angenommen, dass *Rickettsiella* spp. genetisch und biologisch vielfältige, fakultative Endosymbionten mit einer weiten geografischen Verbreitung sind (DURON *et al.*, 2016; GARCIA-VOZMEDIANO *et al.*, 2022).

Die Gattung *Spiroplasma* spp. ist hauptsächlich mit Pflanzen und Arthropoden assoziiert (DAVIS *et al.*, 1972; CISAK *et al.*, 2015). In Zecken wurden *Spiroplasma ixodetis* und *Spiroplasma mirum* nachgewiesen (OGATA *et al.*, 2021). Infektionen mit *Spiroplasma* spp. bei Mäusen und Menschen reichen von Katarakt (CLARK, 1964; FARASSAT *et al.*, 2021) bis hin zu einem möglichen Zusammenhang mit Prionenkrankheiten wie Scrapie, boviner spongiformer Enzephalopathie bei Wiederkäuern oder Creutzfeldt-Jakob-Krankheit beim Menschen (BASTIAN, 2014).

Francisella-ähnliche Endosymbionten (FLE) sind genetisch ähnlich zu *Francisella tularensis* (HODOSI *et al.*, 2022). *Francisella tularensis* ist der Auslöser der Tularämie (YENI *et al.*, 2021) und wird durch Schildzecken (*Amblyomma*-, *Dermacentor*-, *Haemaphysalis*- und *Ixodes*-Zecken) und Lederzecken (*Ornithodoros*-Zecken) übertragen (GORDON *et al.*, 1983). FLE wurden hauptsächlich in den Malpighischen Tubuli, den Eierstöcken und nur sporadisch in den Speicheldrüsen nachgewiesen (AZAGI *et al.*, 2017). Ob FLE über ein pathogenes Potential verfügen, ist bisher unbekannt (ŠPITALSKÁ *et al.*, 2018).

III. PUBLIKATION

1 Publikation Zeckenmikrobiom



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Revealing the Tick Microbiome: Insights into Midgut and Salivary Gland Microbiota of Female *Ixodes ricinus* Ticks

Anna Wiesinger ¹ , Jasmin Wenderlein ¹ , Sebastian Ulrich ¹ , Stephanie Hiereth ¹, Lidia Chitimia-Dobler ² and Reinhard K. Straubinger ^{1,*}

¹ Chair of Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonosis, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, 80539 Munich, Germany

² Bundeswehr Institute of Microbiology (InstMikroBioBw), Neuherbergstraße 11, 80937 Munich, Germany

* Correspondence: r.straubinger@lmu.de

Abstract: The ectoparasite *Ixodes ricinus* is an important vector for many tick-borne diseases (TBD) in the northern hemisphere, such as Lyme borreliosis, rickettsiosis, human granulocytic anaplasmosis, or tick-borne encephalitis virus. As climate change will lead to rising temperatures in the next years, we expect an increase in tick activity, tick population, and thus in the spread of TBD. Consequently, it has never been more critical to understand relationships within the microbial communities in ticks that might contribute to the tick's fitness and the occurrence of TBD. Therefore, we analyzed the microbiota in different tick tissues such as midgut, salivary glands, and residual tick material, as well as the microbiota in complete *Ixodes ricinus* ticks using 16S rRNA gene amplicon sequencing. By using a newly developed DNA extraction protocol for tick tissue samples and a self-designed mock community, we were able to detect endosymbionts and pathogens that have been described in the literature previously. Further, this study displayed the usefulness of including a mock community during bioinformatic analysis to identify essential bacteria within the tick.



Citation: Wiesinger, A.; Wenderlein, J.; Ulrich, S.; Hiereth, S.; Chitimia-Dobler, L.; Straubinger, R.K. Revealing the Tick Microbiome: Insights into Midgut and Salivary Gland Microbiota of Female *Ixodes ricinus* Ticks. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1100. <https://doi.org/10.3390/ijms24021100>

Academic Editor: Denis Sereno

Received: 15 December 2022

Revised: 30 December 2022

Accepted: 2 January 2023

Published: 6 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: *Ixodes ricinus*; microbiome; tick-borne disease; salivary glands; midgut; endosymbiont; *Candidatus* Midichloria mitochondrii

1. Introduction

Ixodes ricinus is the most common tick species in Europe [1] with a biphasic, seasonal activity pattern [2]. In spring, *I. ricinus* begins questing for hosts at temperatures above 7 °C [3,4] and stops in autumn when temperatures lower and days become shorter [5]. Then, the ticks go into diapause until temperatures rise again [6,7], surviving sub-zero temperatures as low as −10 °C [8]. The Fifth Assessment Report of the International Panel on Climate Change (IPCC) assumes a temperature increase of 0.9 to 2.3 °C by 2100, if climate policy is ambitious [9]. This assumption favors an increased reproduction of ticks over the next years, the distribution of hosts and attached ticks into regions and heights that were inhabitable before, and an associated increase in tick-borne disease (TBD) [10]. A connection between the increase of TBD occurrence and climate change has already been described in 2001 for Sweden [11]. In this work, the incidence of TBD was linked to five other variables: two mild winters in succession, temperatures favoring spring development, a long autumn in the previous year, temperatures favorable for ticks questing activity early in the year, and a deeper snow cover. Dautel et al. (2008) [7] first described the activity and the associated host questing of ticks in Germany in the winter of 2006 and 2007. Therefore, in mild winters, forests and park areas are possible locations for tick attachment and thus infections with TBD [7].

TBD include human- and animal-related pathogens such as *Borrelia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis, and tick-borne encephalitis virus. Lyme borreliosis (LB) is the most common bacterial tick-borne disease in the northern hemisphere [12]. This disease is caused by spirochetes from the *Borrelia burgdorferi* sensu lato

(*Bbsl*) complex [13], and the estimated incidence in Bavaria (the location of tick collection in this study) is 40 cases per 100,000 inhabitants [14]. The causative agents of LB induce arthritis as well as neurological and cardiological symptoms in humans [13,15]. However, the diagnosis of this disease is not trivial. Early manifestations may be asymptomatic, nonspecific, or specific with the formation of *erythema migrans* [16]. Detection of the disease by serological methods is possible at the earliest three weeks after infection [17]. Furthermore, treatment of diagnosed LB is not always successful [18,19]. If elimination of borrelial organisms is not possible, the disease may convert into a chronic stage, characterized by alternating symptomatic and asymptomatic phases [20] with a significant reduction in the quality of life [21,22]. The disease's progression and consequences, combined with the lack of vaccination for people, make it necessary to think about new ways to protect against infections with LB and further TBD.

To achieve a precise understanding of individual bacterial species, microorganisms need to be considered in their ecological context. Therefore, the bacterial community (BC) of the tick microbiome is in the focus of this research [23]. The microbiome is defined as the complete community of microorganisms and microbial metabolites, microbial structural elements, and the environmental conditions found in a specific location [24]. The part of the microbiome describing bacteria is defined as BC [24]. It describes single cells to multicellular aggregates and bacterial colonies. Moreover, the BC impacts tissues, organs, and eventually the entire host [25]. Knowledge on common BCs in ticks' microbiome is the key to later identify and describe bacterial species that are endosymbiotic to the tick or even bacterial species symbiotic or competitive to pathogens. Endosymbionts are described as essential bacteria for the development of the host that could influence the host's capacity and fitness [26] and thus the transmission of pathogens [27]. Symbiosis is defined as any type of a close and long-term biological interaction between two different biological organisms. Symbionts must be of a different species, and it does not matter whether this interaction is mutualistic, commensalistic, or parasitic [28]. Hence, identification and characterization of either endosymbionts, symbionts, or competitors within the ticks' BCs might allow a precise manipulation of ticks intending to reduce the spread of TBD in tick populations and the transmission of pathogens to humans and animals.

However, knowledge on the *I. ricinus* tick's microbiome regarding certain tissues is sparse, especially in Germany. There are several studies in Switzerland [29], the Netherlands [30], the Czech Republic [31], Spain [32], Ireland [33], and the US [34] describing the BCs of *Ixodes* spp. To the best of our knowledge, the microbiome of entire *I. ricinus* ticks in Germany has only been described by Hoffmann et al. (2021) [35]. Nevertheless, more comprehensive research on the tick's microbiome concerning individual organs is lacking completely. Consequently, this study aims to define the BC in different tissue (i.e., in salivary glands, in the midgut, and in residual tick material) of *I. ricinus* ticks. Therefore, female ticks were collected, dissected under a stereomicroscope, and DNA was extracted for 16S rRNA gene amplicon sequencing.

2. Results

16S rRNA gene amplification produced a total of 7,847,782 sequences with an average of 37,018 sequences per sample (SD = 13,501) in the final analysis. The OTU (Operational Taxonomic Unit, i.e., molecular species) and zOTU (zero-radius Operational Taxonomic Unit, i.e., molecular strains) table contains a total of 459 OTUs and 882 zOTUs, respectively (Supplementary Tables S1 and S2).

Effective richness and Shannon effective diversity were calculated for α -diversity, and the results compared among complete *I. ricinus* ticks (comT) and different tick tissues' samples (resTm, residual tick material; MG, midgut; SG, salivary glands; Table 1 and Figure 1A). Bacterial communities (BC) in complete ticks (comT) as well as in residual tick material samples from dissected ticks (resTm) were characterized by a higher count of bacterial species compared to specific organs such as midgut (MG) and salivary glands

(SG). α -diversity in SG samples displayed a higher number of species when compared to MG.

The β -diversities of comT and resTm samples (i.e., comparing the microbial profiles between samples) overlapped almost completely, whereas samples from MG and SG differed most (Figure 1B). While SG samples still showed overlaps with comT and resTm samples, MG intersected only with SG samples.

Table 1. Read count and α -diversity (effective richness) shown as average mean.

Sample	Read Count	Effective Richness
comT	34,392	32.8
resTm	38,212	28.3
MG	43,238	4.9
SG	35,674	7.5

comT, complete *I. ricinus* tick; resTm, residual tick material; MG, midgut; SG, salivary gland.

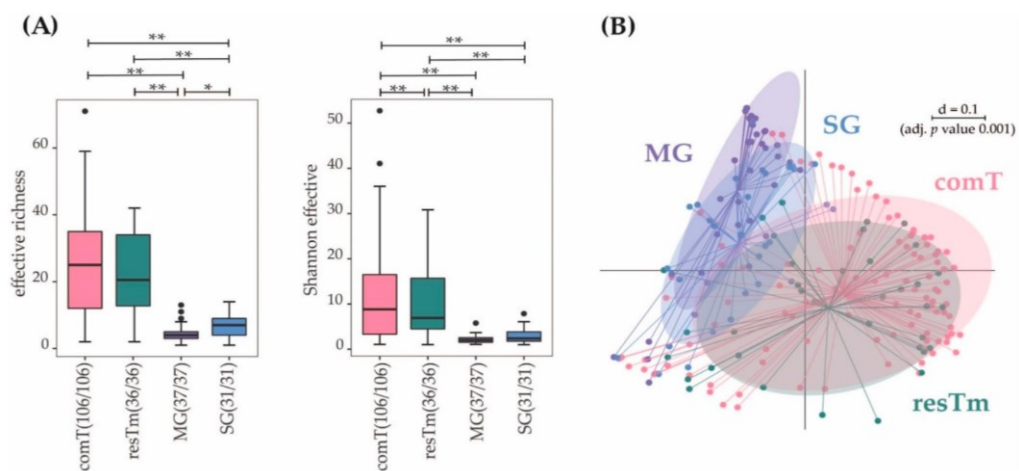


Figure 1. (A) α -diversity shown as effective richness and Shannon effective diversity between different tick tissue samples. Box-plots indicating median (thick bar), upper and lower quartile (within box), and standard deviation (whiskers). Outliers are depicted as dots. Brackets above the individual box-plots point to significance levels for pairwise comparison. (B) β -diversity of all sample types are displayed in a multidimensional-scaling (MDS) plot. The scale is an indicator for the differences in the phylogenetic makeup of microbiota between samples (β -diversity) based on general UniFrac distances ($d = 0.1$, 10% difference). comT, complete *Ixodes ricinus* tick; resTm, residual tick material; MG, midgut; SG, salivary gland. p value summary: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

At the phylum level, Pseudomonadota (previously Proteobacteria) were dominant in all types of samples. Strikingly, Actinomycetota (previously Actinobacteria) was the only phylum with a mean abundance above 7.5% present in SG, resTm, and comT samples. All other phyla were detected with an abundance of less than 7.5% (Figure 2A).

The dominant family in all samples, beside SG, was Midichloriaceae with an especially high abundance in MG samples (57.5%). Here, Pseudomonadaceae, Rickettsiaceae, and Coxiellaceae followed in the descending order. The second strongest abundance of Midichloriaceae was observed in comT samples (27.3%), followed by Pseudomonadaceae, Beijerinckiaceae, and Sphingomonadaceae. The next strongest abundance for Midichloriaceae was observed in SG samples (23.9%), however, Rickettsiaceae dominated this sample

type. After those two families, Pseudomonadaceae, Coxiellaceae, and Anaplasmataceae followed. resTm samples included Midichloriaceae as the most abundant family (18.9%), followed by Pseudomonadaceae and Rickettsiaceae. Interestingly, the environmentally associated families Beijerinckiaceae and Sphingomonadaceae were only present in resTm and comT samples in an abundance above 0.5% (Figure 2B).

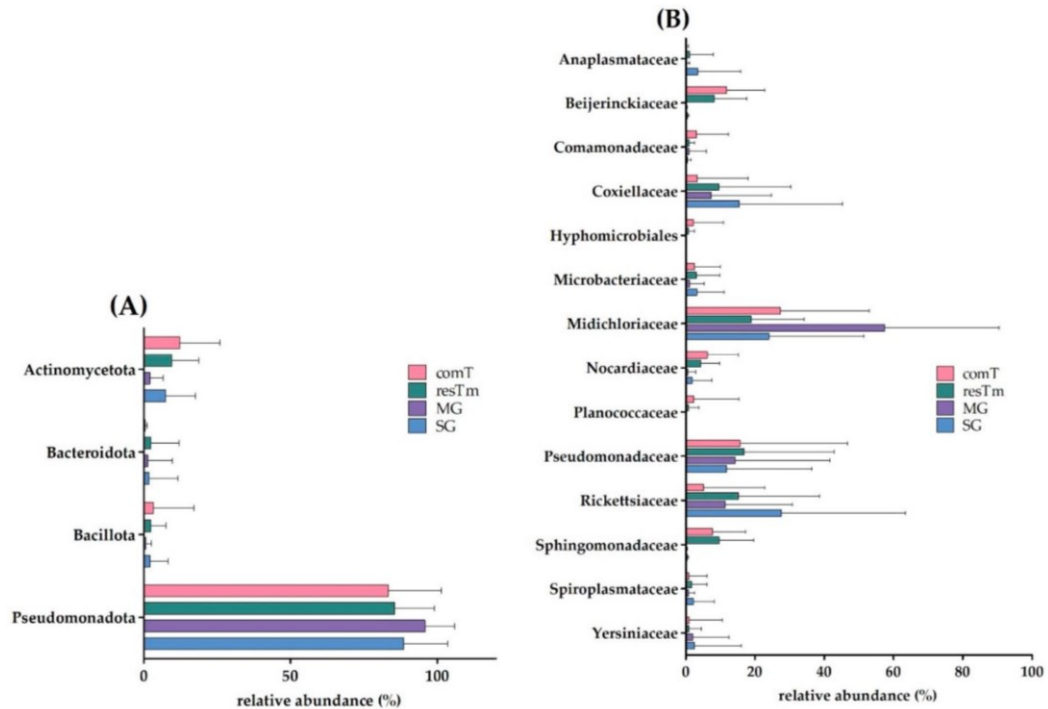


Figure 2. Bar-plots of (A) the four most abundant bacterial phyla and of (B) the fourteen most abundant bacterial families for all types of samples. The end of the bars displays the mean relative abundances (%), while the error bars indicate the standard deviation. comT, complete *Ixodes ricinus* tick; resTm, residual tick material; MG, midgut; SG, salivary gland.

2.1. Complete *Ixodes ricinus* Tick Samples (comT)

In comT samples, a mean of 32.8 effective species was calculated (Table 1, Figure 1A). The mean evenness of comT samples was 0.32 accounting for a stronger dominance of some species compared to the totality of species in this BC. The microbial profiles of comT samples displayed a strong heterogeneity (Figure 1B). In the dendrogram, comT samples mainly clustered on one branch, whereas many outliers appeared on the other two branches (Figure 3). As described above, comT samples were dominated by the phylum Pseudomonadota (83.2%), while at family level Midichloriaceae, Pseudomonadaceae, Beijerinckiaceae, Sphingomonadaceae, Nocardiaceae, and Rickettsiaceae were most abundant (abundance above 5.0%, Figure 2). At genus level, comT samples were dominated by *Candidatus* Midichloria, followed by *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, and *Rickettsia*. At molecular strain level, the complete genus *Candidatus* Midichloria was represented by zOTU1 (*Candidatus* Midichloria mitochondrii, 100% similarity). The second most abundant molecular species was zOTU2 (*Rickettsia helvetica*, 100% similarity), representing the strongest fraction of the *Rickettsia* genus (4.9% of 5.1%). The genus *Pseudomonas* (*P.*) seemed to be composed of various molecular strains in abundances below 3.0%. The four most abundant molecular strains of this genus were zOTU4 (*P. extremaustralis*, 100% similarity), zOTU7 (*P. migulae*, 99.8% similarity), zOTU14 (*P. orientalis*, 99.8% similarity), and zOTU12 (*P. edaphica*, 99.8% similarity) in descending order (Supplementary Table S3).

Interestingly, comT samples included a molecular strain (zOTU3, *Rickettsiella popilliae*, 98.4% similarity) of the genus *Rickettsiella*, which is thought to be an endosymbiont of *I. ricinus* ticks [36]. In total, eleven zOTUs displayed an abundance above 1.0% in comT samples of which all molecular strains not described above were environmentally associated according to literature.

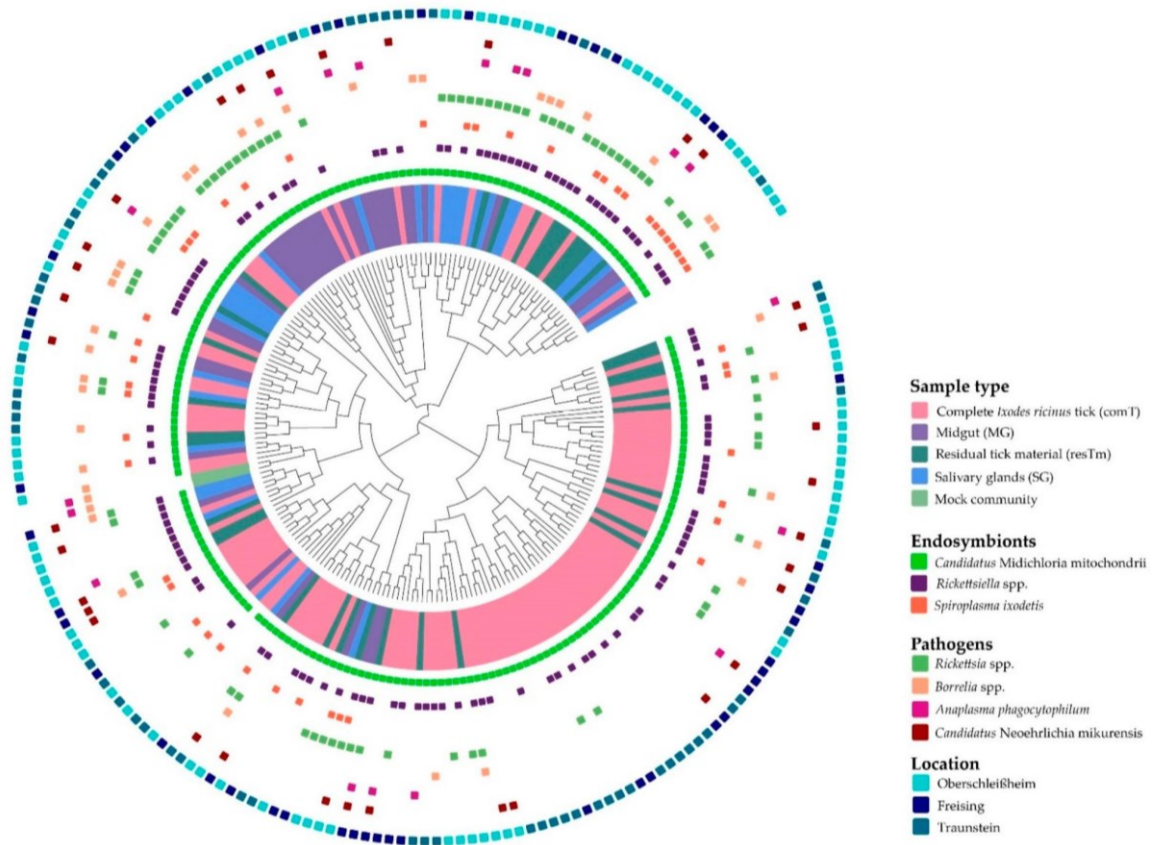


Figure 3. β -diversity is displayed as a circular dendrogram using a phylogenetic tree in the middle to demonstrate the genetic and taxonomic closeness and relationship, as well as the distribution of samples on phylogenetic branches. The innermost circle shows the different types of tissue highlighting their distribution. The next circles display the presence of probable endosymbionts and pathogenic bacteria in the tick microbiome. The outermost circle displays the location of the samples' collection.

2.2. Residual Tick Material Samples (resTm)

A mean of 28.3 effective species was calculated for resTm samples (Table 1). The mean evenness of resTm samples (0.32) equaled the mean evenness of comT samples, demonstrating again that only some species dominate this type of tissue. resTm samples showed a strong heterogeneity in their β -diversity (Figure 1B), which is most obvious on the dendrogram where resTm samples seemingly clustered randomly on all branches (Figure 3). In resTm samples, the dominant phylum was Pseudomonadota (85.4%). At the family level, Midichloriaceae was most abundant, followed by Pseudomonadaceae, Rickettsiaceae, Sphingomonadaceae, Coxiellaceae, and Beijerinckiaceae in descending order (Figure 2). At genus level, resTm samples were again dominated by *Candidatus* Midichloria, followed by *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Rickettsiella*, *Sphingomonas*, and *Methylobacterium*.

At molecular strain level, the genus *Candidatus* Midichloria was represented only by zOTU1 (*Candidatus* Midichloria mitochondrii, 100% similarity). The next strongest molecular species was again zOTU2 (*Rickettsia helvetica*, 100% similarity), followed by two molecular strains of the genus *Rickettsiella* (zOTU3, *Rickettsiella popilliae*, 98.4% similarity and zOTU6, *Rickettsiella popilliae*, 98.7% similarity). Next, the genus *Pseudomonas* was again composed of various molecular strains with abundances below 2.0%. The four most abundant molecular strains of this genus were zOTU7 (*P. migulae*, 99.8% similarity), zOTU10 (*P. poea*, 100% similarity), zOTU11 (*P. synxantha*, 100% similarity), and zOTU4 (*P. extremaustralis*, 100% similarity) in descending order (Supplementary Table S3). Further, with an abundance above 1.0% zOTU20 (*Spiroplasma ixodetis*, 100% similarity), zOTU34 (*Rickettsiella viridis*, 96.6% similarity), and zOTU13 (*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis, 98.4% similarity) occurred in resTm samples. In total, 18 zOTUs displayed an abundance above 1.0% in resTm samples. Molecular strains not described above are associated with the environment according to the literature (e.g., [37–39]).

comT and resTm samples displayed the highest bacterial diversity of all sample types. However, α -diversity parameters of resTm samples were slightly lower compared to comT samples (Figure 1A). Comparing comT and resTm microbial profiles in pairwise β -diversity, both groups apparently clustered close to each other; however, they differed significantly (Figure 4). As the displayed multi-dimensional scaling (MDS) plot is a two-dimensional representation of a three-dimensional plot, visual overlaps in this figure may not manifest in the third dimension. Nevertheless, the p value and the representation of samples in the dendrogram might allow more precise conclusions. Therefore, the difference between comT and resTm was more evident when considering the dendrogram (Figure 3).

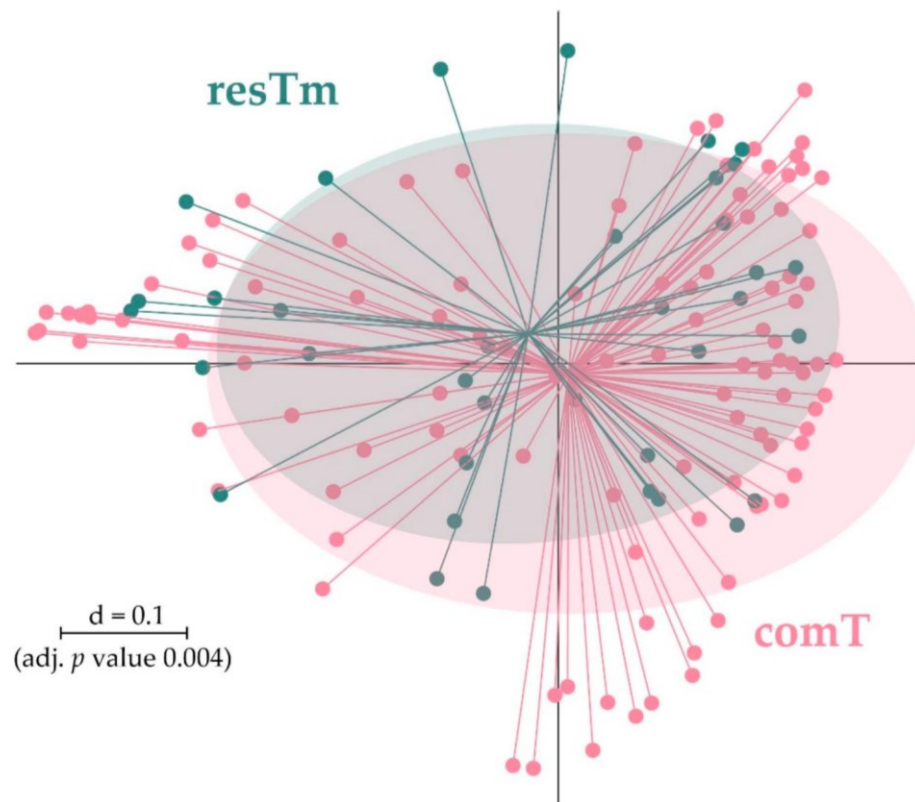


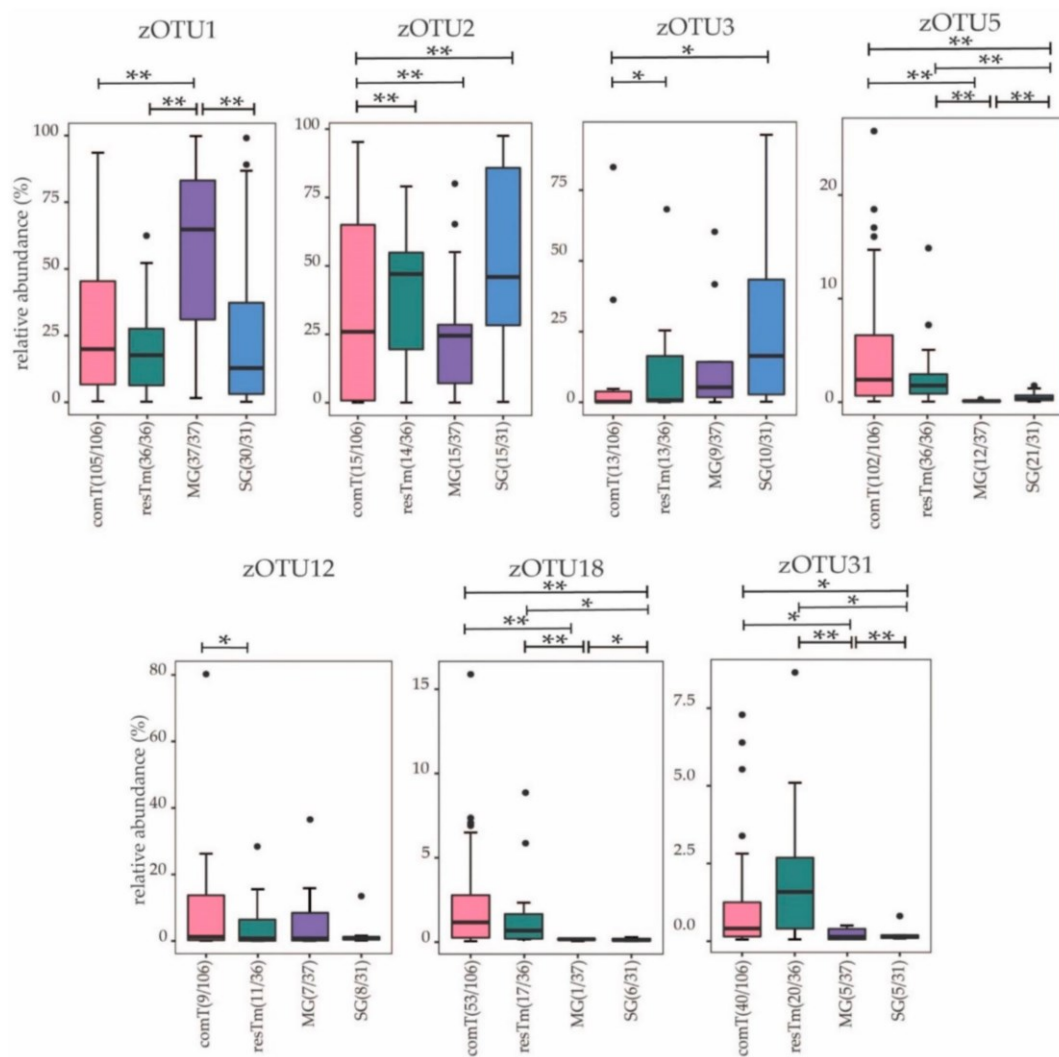
Figure 4. Pairwise β -diversity comparison of resTm and comT displayed as multidimensional-scaling (MDS) plot. The scale is an indicator for the differences in the phylogenetic makeup of microbiota between samples (β -diversity) based on general UniFrac distances ($d = 0.1$, 10% difference). resTm, residual tick material; comT, complete *Ixodes ricinus* tick.

When comT and resTm samples were compared, the genus *Rickettsia* and *Rickettsiella* were observed with a significantly higher abundance in resTm samples (p value ≤ 0.001 and $p \leq 0.05$, respectively). This observation was also significant at the molecular strain level with zOTU2 (*Rickettsia helvetica*, 100% similarity) and zOTU3 (*Rickettsiella popilliae*, 98.4% similarity). Further, the order Hyphomicrobiales ($p \leq 0.05$) with its genus *Bradyrhizobium* ($p \leq 0.001$) were significantly higher and more frequent in comT than in resTm samples (Supplementary Table S4). zOTU12 (*P. edaphica*, 99.8% similarity) was significantly different in abundance between comT and resTm samples (Figure 5). In general, significant differences between comT and resTm need to be considered carefully as resTm represent pooled samples of three ticks and thus some bacterial species might appear overrepresented.

2.3. Midgut Samples (MG)

In MG samples, a mean of 4.9 effective species was obtained. MG samples displayed the lowest α -diversity of all sample types (Figure 1A). Further, its mean evenness was clearly lower than the evenness of comT and resTm samples. With a mean evenness of 0.2 even fewer species seemed to dominate this sample type. At molecular strain level, this was confirmed by an abundance of 57.5% of zOTU1 (*Candidatus Midichloria mitochondrii*, 100% similarity). The microbial profiles of MG samples displayed a strong heterogeneity with two clusters (Figure 1B); nevertheless, on the dendrogram most samples clustered on one branch (Figure 3). At phylum level, Pseudomonadota (95.8%) dominated the MG samples. As mentioned above, over the half of the BC from MG samples consisted of the family Midichloriaceae, followed by Pseudomonadaceae, Rickettsiaceae, and Coxiellaceae. These families were represented by only one genus, respectively (i.e., *Candidatus Midichloria*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, and *Rickettsiella*). As already described, zOTU1 (*Candidatus Midichloria mitochondrii*, 100% similarity) dominated the BC of MG samples. Further, the genus *Rickettsia* was again dominated by zOTU2 (*Rickettsia helvetica*, 100% similarity), likewise the genus *Rickettsiella* by zOTU3 (*Rickettsiella popilliae*, 98.4% similarity) and zOTU6 (*Rickettsiella popilliae*, 98.7% similarity) with a lower abundance. The genus *Pseudomonas* consisted of different molecular species (zOTU11, *P. synxantha*, 100% similarity; zOTU4, *P. extremaustralis*, 100% similarity; zOTU12, *P. edaphica*, 99.8% similarity; zOTU16, *P. lurida*, 100% similarity; Supplementary Table S3). In MG samples, zOTU20 (*Spiroplasma ixodetis*, 100% similarity) was observed as well. In total, eleven zOTUs displayed an abundance above 1.0% in MG samples of which all molecular strains not described above were environmentally associated.

When MG and comT samples were compared, the species richness for both effective richness and Shannon effective diversity in MG samples was significantly lower than in comT samples. The microbial profiles of MG samples clustered farthest from all other sample types; however, MG samples overlapped with comT samples (Figure 1B). As a result of a pairwise comparison, both MG and comT samples differed significantly in their microbial profile. Here, MG and comT samples seemed to overlap slightly (Figure 6A). MG samples were displayed on a different branch of the dendrogram than most comT; however, some outliers were observed (Figure 3). At taxonomic level, MG and comT samples differed significantly concerning various taxonomic levels as described in the Supplementary Table S4. Most important taxa displaying significant differences were the families Midichloriaceae ($p \leq 0.001$) and Rickettsiaceae ($p \leq 0.001$) with its genera *Candidatus Midichloria* ($p \leq 0.001$) and *Rickettsia* ($p \leq 0.001$), respectively, as well as the genus *Rickettsiella* ($p \leq 0.05$). At the molecular strain level, MG and comT samples differed significantly regarding zOTU1 (*Candidatus Midichloria mitochondrii*, 100% similarity), zOTU2 (*Rickettsia helvetica*, 100% similarity), zOTU5 (*Williamsia maris*, 100% similarity), zOTU18 (Beijernickiaceae, 97.7% similarity), and zOTU31 (*Sphingomonas desiccabilis*, 97.7% similarity). In general, significant differences between comT and MG again need to be considered carefully, as MG samples represent pooled samples of three ticks and thus some bacterial species might appear overrepresented.



zOTU1: (459 bp, *Midichloria mitochondrii*, 100%)
 zOTU2: (456 bp, *Rickettsia helvetica*, 100%)
 zOTU3: (504 bp, *Rickettsiella popilliae*, 98.4%)
 zOTU5: (470 bp, *Williamsia maris*, 100%)
 zOTU12: (493 bp, *Pseudomonas edaphica*, 99.8%)
 zOTU18: (440 bp, Beijerinckiaceae, 97.7%)
 zOTU31: (443 bp, *Sphingomonas desiccabilis*, 97.9%)

Figure 5. Box-plot representation of molecular strains relative abundance according to sample types. Box-plots visualize the median (thick bar), upper and lower quartile (within box), and standard deviation (whiskers). Outliers appear as dots. Brackets above the individual box-plots show significance for pairwise comparison. zOTUs were identified by EzBioCloud [40]; the sequence length, the closest relative taxon, and the sequence similarity score of zOTUs are shown in the order of appearance. zOTU: zero-radius operational taxonomic unit. comT, complete *Ixodes ricinus* tick; resTm, residual tick material; MG, midgut; SG, salivary gland. p value summary: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

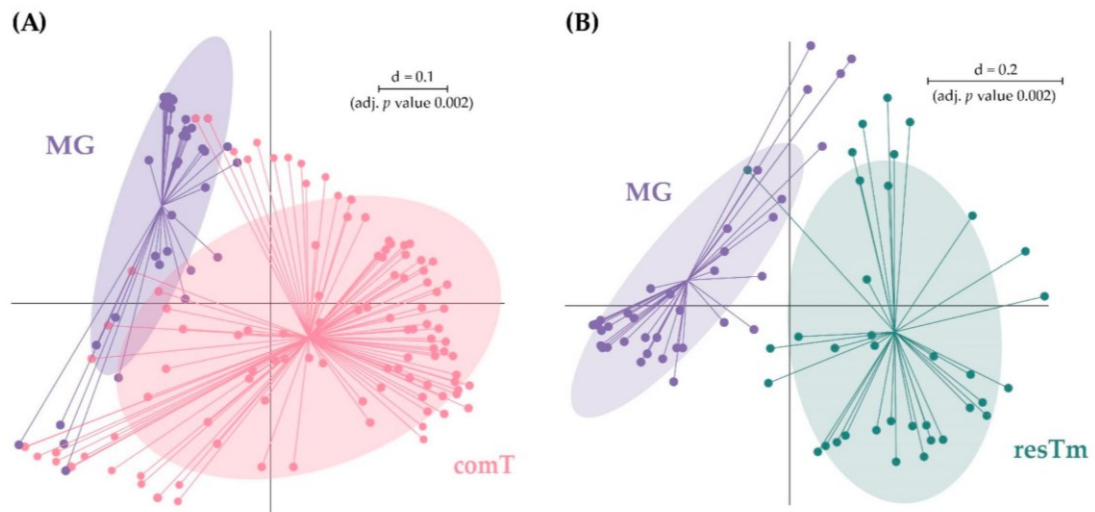


Figure 6. Pairwise β -diversity of the groups (A) MG and comT as well as (B) MG and resTm displayed as multidimensional-scaling (MDS) plot. The scale is an indicator for the differences in the phylogenetic makeup of microbiota between samples (β -diversity) based on general UniFrac distances ($d = 0.1$, 10% difference). comT, complete *Ixodes ricinus* tick; resTm, residual tick materials; MG, midgut.

The α -diversity differed significantly in both effective richness and Shannon effective diversity among MG and resTm samples (Figure 1A). Interestingly, the microbial profiles of MG and resTm samples do not overlap except for one sample (Figure 6B). In general, β -diversity differed significantly between MG and resTm samples (Figure 6B). Again, this was most evident on the dendrogram, where most MG samples clustered on a branch without any resTm sample (Figure 3). Significant differences between MG and resTm samples at taxonomic level are displayed in the Supplementary Table S4. The most important taxa displaying significant differences were the family Midichloriaceae ($p \leq 0.001$) with its genus *Candidatus* Midichloria ($p \leq 0.001$), zOTU18 (Beijernickiaceae, 97.7% similarity), zOTU31 (*Sphingomonas desiccabilis*, 97.7% similarity), and zOTU5 (*Williamsia maris*, 100% similarity) were significantly stronger in resTm when compared to MG samples (Figure 5).

2.4. Salivary Gland Samples (SG)

A mean of 7.5 effective species was calculated for SG samples. These samples displayed the second lowest α -diversity parameters (Table 1). As with the MG samples, the mean evenness of SG samples was 0.2, which again hints that a few species seemed to dominate this type of tissue. The microbial profiles in SG samples overlapped with all other sample types and clustered between MG samples and comT or resTm samples (Figure 1B). Pairwise β -diversity confirmed also that SG samples seemed to overlap with MG, resTm, as well as comT samples (Figure 7A–C). In the dendrogram, SG samples were randomly distributed on the upper two branches, while no SG sample clustered to the lowest branch (Figure 3). Again, Pseudomonadota (88.4%) was the most abundant phylum in this sample type. In contrast to all sample types described above, at family level, SG samples were dominated by Rickettsiaceae, followed by Midichloriaceae and Coxiellaceae in descending order. SG samples displayed the highest count of Anaplasmataceae (3.5%), while all other sample types showed abundances below 1.2% (Figure 2). Families listed above were represented by only one genus, respectively (i.e., *Rickettsia*, *Candidatus* Midichloria, and *Rickettsiella*). Further, for the genus *Pseudomonas*, an abundance above 5.0% was calculated. At molecular strain level, the genera *Rickettsia* and *Candidatus* Midichloria, again, were

represented as described above by zOTU2 and zOTU1, respectively. However, we found another molecular strain for *Rickettsia* spp. with an abundance above 1.0% in SG samples (zOTU33, *Rickettsia felis*, 99.8% similarity). The genus *Rickettsiella* again was represented by the molecular strains zOTU3 (*Rickettsiella popilliae*, 98.4% similarity), zOTU6 (*Rickettsiella popilliae*, 98.7% similarity), and with a lower abundance zOTU34 (*Rickettsiella viridis*, 96.6% similarity). Similar to the other sample types, the genus *Pseudomonas* was represented by three different molecular strains with an abundance above 1.0% (zOTU16, *P. lurida*, 100% similarity; zOTU10, *P. poea*, 100% similarity; zOTU19, *P. laurylsulfatorans*, 100% similarity). Moreover, zOTU13 (*Candidatus Neorhlichia mikurensis*, 100% similarity) represented the complete Anaplasmataceae family and zOTU20 (*Spiroplasma ixodetis*, 100% similarity) was observed with an abundance above 1.0% in SG samples.

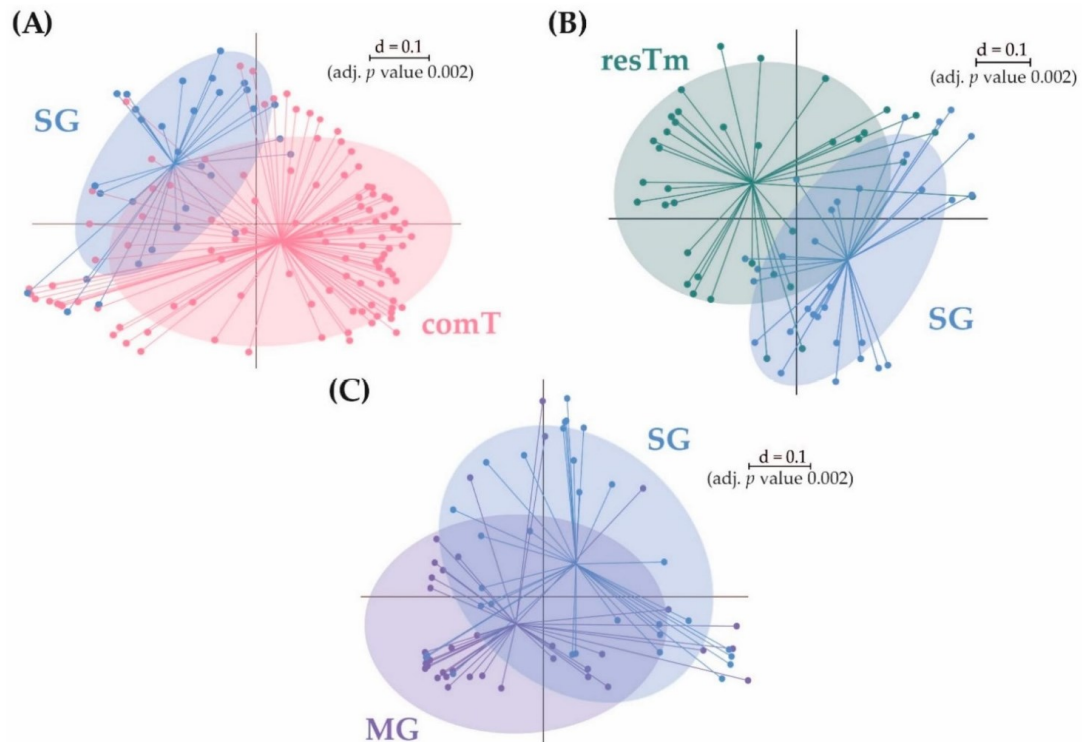


Figure 7. Pairwise β -diversity of the groups (A) comT and SG, (B) resTm and SG as well as (C) MG and SG displayed as multidimensional-scaling (MDS) plot. The scale is an indicator for the differences in the phylogenetic makeup of microbiota between samples (β -diversity) based on general UniFrac distances ($d = 0.1$, 10% difference). comT, complete *Ixodes ricinus* tick; resTm, residual tick material; MG, midgut; SG, salivary gland.

Both effective richness and Shannon effective diversity were significantly lower in SG samples than in comT samples (Figure 1A). SG samples' microbial profiles differed significantly from comT samples (Figure 7A), which is most obvious in the dendrogram, where no SG sample was aligned to the lower right branch containing most comT samples (Figure 3). Taxa differing significantly between SG and comT samples are shown in Supplementary Table S4, of which the genera *Rickettsia* and *Rickettsiella* ($p \leq 0.001$ and $p \leq 0.05$) seemed most important. According to the literature available, most other taxa displaying significant differences seemed to be associated to the environment. Comparing SG with comT samples at molecular strain level, significant differences were observed in zOTU18 (Beijernickiaceae, 97.7% similarity), zOTU2 (*Rickettsia helvetica*, 100% similarity), zOTU3

(*Rickettsiella popilliae*, 98.4% similarity), zOTU31 (*Sphingomonas desiccabilis*, 97.7% similarity), and zOTU5 (*Williamsia maris*, 100% similarity). In general, differences between comT and SG require careful interpretation, as SG samples represent pooled samples of three ticks and thus some bacterial species might appear overrepresented.

The α -diversity (i.e., effective richness and Shannon effective diversity) differed significantly between SG and resTm samples, and SG and resTm samples diverged significantly in their microbial profiles (Figure 7B). Significant differences at taxonomic level between SG and resTm samples are depicted in the Supplementary Table S4. Between these two groups, zOTU18 and zOTU5 differed significantly at molecular strain level (Figure 5).

The effective richness differed significantly, while Shannon effective diversity showed none among SG and MG samples. These groups displayed diverging microbial profiles (Figure 7C); again, this is most obvious in the dendrogram (Figure 3). In Supplementary Table S4, the difference in the relative abundances of the family Midichloriaceae ($p \leq 0.001$) with its genus *Candidatus* Midichloria ($p \leq 0.001$) seemed most important. The molecular strains zOTU1, zOTU18, zOTU31, and zOTU5 differed significantly between SG and MG samples (Figure 5).

In conclusion, the effective richness was highest in comT and resTm samples, as was the mean evenness, while SG and MG samples displayed a lower effective richness and evenness. MG samples displayed the lowest counts in effective richness (Table 1). In β -diversity, there were significant differences between all groups' ecological profiles. All samples were dominated by the phylum Pseudomonadota. The most abundant family in all groups, except for SG samples, was Midichloriaceae. In SG samples, Rickettsiaceae were more abundant than Midichloriaceae. In comT, resTm, and MG samples, the second most abundant family was Pseudomonadaceae. Rickettsiaceae and Coxiellaceae were frequently present in resTm, MG, and SG samples. All samples contained zOTU1 except two, one comT sample which did not contain any zOTU1 at all and one SG sample which contained zOTU1 at a very low relative abundance.

2.5. Occurrence of Endosymbionts and Probable Pathogenic Species

As stated in the literature available to us, 16S rRNA gene amplicon sequencing is not able to soundly decipher the exact species level [41]. Therefore, species classification was assessed by comparing the molecular strains to well-characterized reference strains, and similarity was calculated based on the number of variations observed between the two strains [40]. Species described below will be addressed as "probable" endosymbionts or pathogens. The mock community included in this study contained several pathogens (i.e., *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* subsp. *garinii*, *Borrelia garinii* subsp. *bavariensis*, and *Anaplasma phagocytophilum*), and molecular species that were identified with the help of the mock community indicate said species. Consequently, in tick samples, we assigned reads to various species either by their frequency of appearance and strain similarity (i.e., probable symbionts or commensals, *Candidatus* Midichloria mitochondrii, *Rickettsiella* spp., and *Spiroplasma ixodetis*), or by their appearance in both sample and mock community (i.e., for *Borrelia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum*), or in the case of *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis and *Rickettsia* spp. by strain similarity.

Considering probable symbionts and commensals, *Candidatus* Midichloria mitochondrii was observed in 99.5%, while the genus *Rickettsiella* was observed in 60.9% of all tick samples. *Spiroplasma ixodetis* was found in 23.3% of all tick samples (Figure 3). *Candidatus* Midichloria mitochondrii was represented by one zOTU, *Rickettsiella* spp. and *Spiroplasma ixodetis* were represented by several zOTUs (Table 2).

Table 2. Probable endosymbiotic species detected in *Ixodes ricinus* ticks and their assigned zOTUs.

Species	zOTUs
<i>Candidatus</i> Midichloria mitochondrii	zOTU1 (<i>Candidatus</i> Midichloria mitochondrii, 100% similarity)
<i>Rickettsiella</i> spp.	zOTU3 (<i>Rickettsiella popilliae</i> , 98.4% similarity)
	zOTU34 (<i>Rickettsiella viridis</i> , 96.6% similarity)
	zOTU43 (<i>Rickettsiella isopodorum</i> , 100% similarity)
	zOTU59 (<i>Rickettsiella grylli</i> , 98.4% similarity)
	zOTU6 (<i>Rickettsiella popilliae</i> , 98.7% similarity)
<i>Spiroplasma ixodetis</i>	zOTU20 (<i>Spiroplasma ixodetis</i> , 100% similarity)
	zOTU87 (<i>Spiroplasma ixodetis</i> , 98.8% similarity)

The probable pathogenic species *Rickettsia* was observed in 41.1% of all tick samples. *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis was found in 16.2%, *Borrelia* spp. in 12.4%, and *Anaplasma phagocytophilum* in 8.1% of all samples (Figure 3). The genus *Rickettsia* and *Borrelia* consisted of five different zOTUs, while *Anaplasma phagocytophilum* was assigned to four zOTUs. In contrast, *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis consisted of only one zOTU (Table 3).

Table 3. Probable pathogenic species detected in *Ixodes ricinus* ticks and their assigned zOTUs.

Species	zOTUs
<i>Rickettsia</i> spp.	zOTU108 (<i>Rickettsia monacensis</i> , 100% similarity)
	zOTU173 (<i>Rickettsia bellii</i> , 99.6% similarity)
	zOTU2 (<i>Rickettsia helvetica</i> , 100% similarity)
	zOTU226 (<i>Rickettsia</i> spp., 94% similarity)
	zOTU33 (<i>Rickettsia felis</i> , 99.8% similarity)
<i>Candidatus</i> Neoehrlichia mikurensis	zOTU13 (<i>Candidatus</i> Neoehrlichia mikurensis, 98.4% similarity)
<i>Borrelia</i> spp.	zOTU968 (<i>Borrelia miyamotoi</i> , 98.6% similarity)
	zOTU1616 (<i>Borrelia garinii</i> subsp. <i>garinii</i> , 100% similarity)
	zOTU1977 (<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto, 100% similarity)
	zOTU3122 (<i>Borrelia afzelii</i> , 100% similarity)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	zOTU1296 (<i>Borrelia garinii</i> subsp. <i>bavariensis</i> , 100% similarity)
	zOTU364 (<i>Anaplasma phagocytophilum</i> , 99.8% similarity)
	zOTU370 (<i>Anaplasma phagocytophilum</i> , 99.8% similarity)
	zOTU405 (<i>Anaplasma phagocytophilum</i> , 99.6% similarity)
	zOTU656 (<i>Anaplasma phagocytophilum</i> , 99.6% similarity)

Describing the prevalence of probable endosymbionts and pathogens, only comT samples were considered, as all other tissue samples were pooled in three and thereby cannot represent the tick population accordingly. This resulted in a prevalence of 99.0% for *Candidatus* Midichloria mitochondrii, a prevalence of 72.6% for *Rickettsiella* spp., and a prevalence of 12.3% for *Spiroplasma ixodetis* in comT samples. The same applies for probable pathogenic species. A prevalence of 21.7% was observed for *Rickettsia* spp., a prevalence of 11.3% for *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis, a prevalence of 5.7% for *Borrelia* spp., and a prevalence of 3.8% for *Anaplasma phagocytophilum* in comT samples.

3. Discussion

The aim of this study was to describe the BC of female *I. ricinus* ticks. In addition, bacterial communities in specific tick tissues were characterized. For this reason, midguts (MG), salivary glands (SG), and residual tick material without midgut and salivary glands (resTm) were obtained by microscope-aided dissection and analyzed in pools of three individuals. Overall, the quality of sequencing reads was highly satisfying, as read counts and rarefaction were highly comparable between the samples. However, we decided to

apply the cutoff at a minimum of 10,000 reads to guarantee a reliable and comparable read quality in the final analysis and thus avoid biases. As a result, seven samples with fewer than 10,000 reads were excluded. comT samples contained all tissues such as MG, SG, and resTm, which were analyzed in separate tests. Thus, all bacteria found in the tissue samples are expected in comT samples. As the dissection of ticks is delicate and tissues could not always be separated from each other, we expected residuals of MG and SG in resTm samples. Whereas MG samples could be isolated with high certainty, SG samples might contain other tissues—for example, the Malpighian tubules. This assumption was confirmed by the data (Figure 7). As expected, bacteria associated with the environment occurred mostly in comT as well as in resTm samples, as these tissues had direct contact with the natural environment. This already has been described by Ross et al. (2018) [34] as have methods eliminating environment-associated bacteria (e.g., washing ticks in sterile water [34], 5.0% sodium hypochlorite, DNA away, Reactive Skin Decontamination Lotion (RSDL), 70% ethanol [42], or using Benzonase[®] endonuclease [43]). In this study, these methods were omitted as our focus rested on the complete BC of ticks as encountered in the field. Moreover, environment-associated bacteria might allow conclusions on the tick's location, especially concerning the geographical distribution of tick-borne pathogens [44]. In contrast, the environmental BC was problematic when analyzing low biomass samples (i.e., MG or SG samples) as the proportion of total bacterial DNA in these samples was already low and high amounts of environmental BC might be overamplified in the PCR steps. This could lead to a lower representation or even the non-detection of pathogens or symbionts that appear in low numbers during bioinformatic analysis. As a result, we decided to pool tick tissues (especially MG and SG) as already suggested by Ross et al. (2018) and Gall et al. (2016) [34,45]. We found several molecular bacterial strains with an abundance of more than 1.0% that, according to the literature available to us, might be associated with the environment: zOTU5 (*Williamsia maris*, 100% similarity), which was characterized as an ocean-associated bacteria [37]; zOTU15 (*Luteibacter anthropi*, 98.7% similarity), which was first isolated from human blood [46], while most other *Luteibacter* spp. are associated with the environment [47,48]; zOTU17 (*Variovorax paradoxus*, 100% similarity), which was described to be associated with soil and water [49]; zOTU18 (Beijerinckiaceae, 97.7% similarity), a microorganism that so far was identified only at the family level (accession number PAC0001013); zOTU26 (*Methylobacterium haplocladii*, 100% similarity), which was described to be associated with plants [50]; zOTU31 (*Sphingomonas desiccabilis*, 98.0% similarity) that was published to be associated with soil crust [38]; and zOTU36 (*Stenotrophomonas lactitubi*, 99.8% similarity), a bacterium that was isolated from surfaces with food contact [51], while other *Stenotrophomonas* spp. are associated with plants [39]. Further, zOTU42 (*Chryseobacterium lactis*, 99.6% similarity) was described to be associated with milk [52], whereas other *Chryseobacterium* spp. were linked to rhizosphere soil [53,54]. Lastly, zOTU53 (*Microbacterium liquefaciens*, 99.0% similarity) was isolated from environmental samples [55] and soil [56]. Fittingly, these molecular strains were mainly found in comT and resTm samples as already mentioned above. In MG and SG samples, however, environment-associated bacteria were observed at low abundances.

Another aim of this study was the identification of endosymbionts and pathogens within the ticks' BC. Hence, a tick-specific mock community was designed. On one side, a mock community is used to identify possible deficiencies during DNA extraction, library preparation, and sequencing [57,58]. On the other hand, we anticipated to ease the identification of low-abundant tick pathogens such as *Borrelia* spp. and *Anaplasma* spp. The mock community was self-assembled with known strains; thus, we can surely comprehend the identity of bacterial strains in the mock community. The bioinformatic pipeline identifies the strains by comparing the sequences with a database, and thus strain identity on species level is only estimated. Both approaches in combination allow a precise identification of bacterial strains in the mock community and even allow a comprehension with the bacterial strains in project samples. In fact, this mock community allowed a precise identification of different pathogenic genera even at low abundances. Furthermore, we

observed that the exclusion of the mock community had a negative effect on the occurrence of known pathogens. During analysis on IMNGS, an abundance cutoff of 0.25% was set, thus molecular strains with an abundance below this level were sorted out. As the mock community contained these molecular strains in high abundances, the cutoff was not applied for these species and known organisms were evident in the OTU table. Consequently, mock communities can serve as a helpful tool for the detection and identification of low-abundant bacteria in microbiome research [57]. Additionally, it is advisable to use an even more spectrum-enlarged mock community containing an even higher number of project-specific bacteria expected to be present at a low abundance. For tick samples, *Borrelia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* as well as bacteria not associated with ticks were used as a mock community. It might be advisable to further include *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia* spp., *Francisella tularensis*, or bacteria of the tick-borne relapsing fever complex in the mock community as these microorganisms may inhabit the vector tick. Here, we also added DNA from *Leptospira interrogans* to the mock community to serve as a negative control, since this spirochete has not been described to be taken up by ticks and consequently should not be detected in the BCs of ticks.

A primary focus of the project was the goal to identify and characterize possible endosymbionts within the ticks' BC. In all ticks with the exception of one sample, we found *Candidatus* Midichloria mitochondrii (zOTU1) in high abundances, which suggests that this bacterium might play an essential—possibly endosymbiotic—role in the BC of *I. ricinus* ticks. This has already been described multiple times [59,60]. *Candidatus* Midichloria mitochondrii first has been reported to be present in *I. ricinus* ticks in 2004 [60] and is thought to reside in the mitochondria of tick cells. Furthermore, this endosymbiont is presumed to have a mutualistic relationship with the tick. *Candidatus* Midichloria mitochondrii holds genes for biosynthesis of B vitamins as well as *cbb*₃-type cytochrome *c* oxidase and might be a source for ATP under low-oxygen conditions [61,62]. In female ticks, an abundance of almost 100% was described in ovary cells but without major impact on reproduction, whereas in male ticks an abundance of only 40% was reported [63].

Rickettsiella spp. have been described as facultative, intracellular symbionts within ticks as appropriate host [36]. *Rickettsiella popilliae* (zOTU3, 98.4% similarity and zOTU6, 98.7% similarity) and *Rickettsiella grylli* (zOTU59, 98.4% similarity) have already been described in ticks [64] and were also present in this data set. *Rickettsiella grylli* is thought to be probably pathogenic to mammals due to its low host specificity and can infect mammals even via inhalation [65]. Additionally, we found *Rickettsiella viridis* (zOTU34, 96.6% similarity) and *Rickettsiella isopodorum* (zOTU43, 100% similarity). *Rickettsiella* spp. are represented in all life stages of *I. ricinus* ticks as described by Garcia-Vozmediano et al. (2021) [36]. Survival of ticks in subsequent life stages could probably be improved with the presence of *Rickettsiella* spp. Depending on the geographical location, there might be a broad genetic variability of *Rickettsiella* spp. Another biological characteristic of *Rickettsiella* spp. is the manipulation of its attractiveness to predators and parasitoids [66]. Coinfections between *Candidatus* Midichloria mitochondrii and *Rickettsiella* spp. were published as the most frequent coinfections in ticks throughout Europe [36].

Spiroplasma ixodetis (zOTU20, 100% similarity and zOTU87, 98.8% similarity) was firstly described in *I. pacificus* ticks in the US in 1995 as an intracellular microorganism [67]. Similar *Spiroplasma* spp. isolated from *I. ricinus* in Germany, have in the meantime been described by Henning et al. (2006) [68]. *Spiroplasma* spp. have been isolated from unfed adult *I. ricinus* ticks of both genders and from tick eggs, which indicates that these microorganisms might be endosymbionts [69]. However, there are some strains pathogenic for plants, insects, and even humans [70,71]. *Spiroplasma mirum* (zOTU460, 99.6% similarity) has been reported to induce cataract in mice [72] and seldomly in humans [73], whereas for *Spiroplasma* spp. infection in general was associated with transmissible spongiform encephalopathy in ruminants and humans [74]. Nevertheless, spiroplasmal infectivity and pathogenicity still need more investigation. Apparently, there is a negative association between the occurrence of *Borrelia* spp. and *Spiroplasma* spp. in ticks, as well as between *Spiroplasma* spp., *Rickettsia*

spp., and *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* [29]. Named pathogens were found in our study as well.

Bbsl is widely known as an agent of LB [13] in humans and animals with a seroprevalence of 9.4% in humans [75] and 22.2% in dogs [76]. Here, we reported a *Bbsl* prevalence of 5.7% in *I. ricinus* ticks, which is comparable to other studies with prevalence varying from 6.1% to 20.0% in Germany [36,77,78].

Another emerging pathogen, *Rickettsia helvetica*, belongs to the spotted fever group rickettsiae. The primarily called “Swiss Agent” was described by Burgdorfer et al. (1979) [79] for the first time and was confirmed as *Rickettsia helvetica* in 1993 [80]. In the literature, *Rickettsia helvetica* is presumed to be pathogenic for humans [81–83]. Contrary, *Rickettsia* spp. are assumed to be symbionts to the ticks as they might provide nutrients such as folate. This endosymbiotic support is necessary as the ticks’ blood meal does not supply B vitamins [84]. In this work, a prevalence of 19.8% was calculated for *Rickettsia helvetica* in *I. ricinus* ticks. In dogs, a seroprevalence of 66.0% was reported in Germany [85], while in ticks, prevalence varied between 12.0% and 99.8% [86–88].

Further, the intracellular microorganism *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* was published by Kawahara et al. in 2004 [89] for the first time, but probably was described by Schouls et al. in 1999 [90] and by Pan et al. in 2003 [91] in the past. This still uncultured bacterium causing neoehrlichiosis has been found in *I. ricinus* ticks already [92]. In humans, the first case reports regarding infections with *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* were published in 2010 [93–95]. To the best of our knowledge in the literature, only one case report exists where this bacterium was isolated from a dog [96]. In this examination, a prevalence of 11.3% was calculated for *I. ricinus* ticks, while other authors described a prevalence of 24.0% in Germany [92] or 4.2% in Austria [97].

Tick-borne fever in sheep was described in 1932 [98], and in 1949 the infectious agent *Rickettsia phagocytophilum* was identified firstly [99]. Later, this microorganism was reordered and renamed to *Anaplasma phagocytophilum* [100]. Currently, *Anaplasma phagocytophilum* is further reported as the agent of human, canine, and equine granulocytic anaplasmosis and is present in intracytoplasmatic vacuoles [100]. In this study, the prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *I. ricinus* ticks was 3.8%. The literature showed a similar prevalence between 3.6% and 11.6% [101,102]. In dogs, a seroprevalence of 43.0% was reported for Germany [103], while in humans, a seroprevalence of 8.7% was calculated [104].

In conclusion, this work describes a new approach of dissecting ticks and isolating tick tissue, extracting tick DNA using an automated DNA extraction method, and the use of a tick-specific mock community to identify tick-specific pathogens and endosymbionts. With this method, we were able to identify ticks’ endosymbionts described by other authors, as well as pathogens known to be TBD. An advantage of this new, automated DNA extraction protocol is its easy and time-friendly handling. Further, as all steps of DNA purification are conducted mechanical, the contamination and human error are reduced in these steps. This is very important when handling low biomass samples. This approach and further recommendations for using a tick-specific mock community—possibly even a computational constructed mock community—allow the observation of tick populations regarding the prevalence of pathogens in a certain area as well as the development of pathogen abundances. This approach might further be used as a possibility to assess the danger of TBD infections in certain forest and park areas and thus might allow a hazard assessment and specific premonition.

4. Materials and Methods

4.1. Tick Sampling

A total of 210 ticks were collected in autumn 2021 (September and October; Table 4) using the flagging method. For this purpose, a white flannel sheet was dragged slowly over pasture, woodland, and vegetation. Only female *I. ricinus* ticks were collected from three different locations in Germany: Grendacher forest, a private woodland near Traun-

stein, Kranzberger, a state forest near Freising, and Schleißheimer Schlosspark in Ober-schleißheim, a public park near Munich. All areas are risk areas for Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis virus [105]. Ticks were collected from the sheet with forceps and were placed into tubes separately. The dissection of the ticks was conducted directly the day after collection avoiding possible microbiome shifts (e.g., due to starvation of the tick or prolonged periods of cold temperatures). Until then, the samples were stored at 4 °C.

Table 4. Overview of the prepared samples.

Sample Type	Number of Samples
Collected female <i>Ixodes ricinus</i> ticks	210
Dissected tick samples	104
Midgut samples (MG) *	37
Salivary gland samples (SG) *	31
Residual tick material samples (resTm) *	36
Complete tick samples (comT)	106

* in pools of three.

4.2. Dissection of Female *Ixodes ricinus* Ticks

Dissection of 104 female ticks was conducted using a stereomicroscope with a magnification of up to 120× and depth of focus (Leica M205 C with FusionOptics, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). First, ticks were fixed on top of a microscope slide using super glue (UHU Sekundenkleber Pipette, UHU GmbH & Co. KG, Bühl, Germany; Supplementary Figure S1). While the glue dried, tubes for the three different tissues (i.e., resTm, MG, and SG) were prepared with 100 µL sterile-filtered phosphate-buffered saline (PBS, Carl Roth, Karlsruhe, Germany). The scutum of the tick was removed using a scalpel blade (No. 11, Ribbel Import-Export GmbH & Co. KG, Wuppertal, Germany) and inserted into the tube for residual tick material (resTm; Supplementary Figure S2). As the tick's internal tissues were accessible after removing the scutum, the MG and SG were removed next with jewelers' forceps (Dumont No. 5, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (Supplementary Figure S3) and transferred into corresponding tubes prefilled with PBS. The residual tissues of the tick, such as legs, capitulum (head), remaining tissue, and idiosoma (body) were further added to the residual tick material tube (resTm). All dissected tissue samples were processed in pools of three to increase input biomass, sequencing quality, and to reduce noise from reagent-based or environmental contamination [34]. Samples were stored at −30 °C until DNA isolation.

4.3. DNA Extraction

Complete ticks (comT samples; $n = 106$) were crushed multiple times using a scalpel blade. Afterward, crushed ticks were transferred into a lysing matrix tube (Lysing Matrix tube D, 2.0-mL tube, MP Biomedicals, Eschwege, Germany). A total of 300 µL of Incubation Buffer (D920B-C, Promega GmbH, Walldorf, Germany) were added then. All samples were transferred into the FastPrep-24™ device (MP Biomedicals) and homogenized in one cycle of 5.5 m/s for 30 s. After the homogenization step, 30 µL of 20-mg/mL Proteinase K (included in AS1290, Promega GmbH) and 200 µL of Lysis Buffer (included in AS1290, Promega GmbH) were added to the sample. After mixing (Vortex-Genie 2, Scientific Industries Inc., New York, NY, USA) and ten seconds of centrifugation at 10,000× g (Eppendorf Centrifuge 5430, Eppendorf SE, Hamburg, Germany), the samples were incubated at 56 °C and 350 rpm for a minimum of two hours on the shaker (ThermoMixer C, Eppendorf SE). Next, 5 µL of 10-mg/mL RNase A (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were added and the samples were incubated for another 20 min at 37 °C and 350 rpm on a shaker (ThermoMixer C, Eppendorf SE). Then, 300 µL of Lysis Buffer (Promega GmbH) were added to each sample. The mixing (Vortex-Genie 2, Scientific Industries Inc.) and centrifugation steps were repeated as described above. Dissected tick samples ($n = 104$)

were transferred into a tube with 300 μL Incubation Buffer (D920B-C, Promega GmbH), then 30 μL of 20-mg/mL Proteinase K (included in AS1290, Promega GmbH) and 200 μL of Lysis Buffer (included in AS1290, Promega GmbH) were added to the sample. Afterward, samples were mixed (Vortex-Genie 2, Scientific Industries Inc.) and centrifugated for ten seconds until reaching $10,000\times g$ (Eppendorf Centrifuge 5430, Eppendorf SE). Thereafter, the samples were incubated at 56°C and 350 rpm for a minimum of two hours on the shaker (ThermoMixer C, Eppendorf SE). Next, 5 μL of 10-mg/mL RNase A (Thermo Fisher Scientific) were added, and the samples were incubated for another 20 min at 37°C and 350 rpm on a shaker (ThermoMixer C, Eppendorf SE). Afterward, 300 μL of Lysis Buffer (Promega GmbH) were added to each sample. The mixing (Vortex-Genie 2, Scientific Industries Inc.) and centrifugation steps were repeated as described above. Furthermore, negative controls testing the dissection work (especially the instruments), the cartridge of the MaxWell 16 MDx purification system, and all reagents were prepared according to the tick tissue samples. Complete *I. ricinus* ticks, dissected tick samples, and negative controls were transferred into the MaxWell 16 LEV Blood DNA Kit cartridges (included in AS1290, Promega GmbH), and the automatized DNA purification process using the Maxwell 16 MDx (Promega GmbH) was conducted. The samples were eluted in 60 μL Elution Buffer (included in AS1290, Promega GmbH). After DNA extraction, DNA content was measured using BioPhotometer (D30, Eppendorf SE). Samples were stored at -30°C until further processing. An amount of 20 μL DNA was shipped to Eurofins Genomics laboratory (Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Germany) where sequencing of the 16S rRNA gene was performed.

4.4. Design and Creation of the Mock Community

Seven bacterial species and strains available at the Chair of Bacteriology and Mycology of LMU Munich, Germany were individually thawed, cultured, and DNA was isolated to construct a mock community. The DNA for *Anaplasma phagocytophilum* and *Leptospira interrogans* was isolated from previous experiments and thus only thawed and reused. For DNA extraction, the MaxWell 16 MDx purification system was used following the same DNA extraction protocol as described for dissected tick samples. Afterward, the isolated DNA was pooled to construct the mock community. Four different *Borrelia* genospecies (Table 5) were used to possibly identify *Borrelia* spp. occurrence in the prepared tick samples. *Anaplasma phagocytophilum* was added as it represents another pathogenic bacterium other than *Borrelia* spp. appearing in *I. ricinus* ticks. As a common intestinal bacterium in the 16S rRNA microbiome analysis *Escherichia coli* was added to the mock community because it is easy to detect. As negative control, the spectrum of the self-designed mock community was enlarged with *Leptospira interrogans* as this bacterium should not be present in a tick sample.

Table 5. Species and amount of gDNA used for mock community.

Species	Amount of gDNA Used (ng)
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto N40 P2	12
<i>Borrelia afzelii</i> P Per P1	12
<i>Borrelia garinii</i> subsp. <i>garinii</i> P Be P1	12
<i>Borrelia garinii</i> subsp. <i>bavariensis</i> P Bn P1	12
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	12
<i>Escherichia coli</i>	12
<i>Leptospira interrogans</i> LHJ P93	12

4.5. Bacterial 16S rRNA Gene Sequencing

The BC of extracted tick samples and tissue samples was sequenced at Eurofins Genomics laboratory (Eurofins Genomics GmbH) by targeting the hypervariable V1–V3

region of the 16S rRNA gene (primers: 27F: 5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG-3' and 519R: 5'-GTA TTA CCG CGG CKG CTG-3' [106]). A two step-PCR was executed preparing the samples for sequencing [107]. The first PCR was conducted to amplify the 16S rRNA target gene (V1–V3 region). The second PCR was conducted to barcode the amplified PCR products of the first PCR generating a DNA library. Here, Illumina adaptor sequences were added to the PCR primers. The DNA concentrations were measured by a fluorometric method. The final pool was sequenced in paired-end mode (2×300 bp) and pipetted into the well of the Illumina cartridge using MiSeq Reagent Kit v3.

4.6. Data Analysis

16S rRNA gene amplicon data were analyzed as described previously [108] with the following changes. As sequencing data arrived demultiplexed, data were merged using a Perl script from the IMNGS website (<https://www.imngs.org/static/files/remultiplexor.zip>; accessed on 22 August 2022) generating I1, R1, and R2 files. These files were then checked for quality using FastQC [109], and sequence quality per base for R1 and R2 has been provided as Supplementary Figures S4 and S5. The named multiplexed fastq files were then processed using the “Integrated Microbial Next-Generation Sequencing” (IMNGS) pipeline [110], a UPARSE-based platform [111]. Sequences were demultiplexed, with a quality trimming score of less than 15, and paired. Paired reads with an expected error of less than two and sequences with a length smaller than 300 and higher than 600 nucleotides were excluded from the further analysis. To prevent analysis of the regions with distorted base composition observed at the start of sequences, the remaining reads were trimmed with a trimming length of ten nucleotides on each end. The presence of chimeras was tested with UCHIME [112]. IMNGS supplies both operational taxonomic units (OTUs) and denoised zero-radius operational-taxonomic units (zOTUs) for different parts of the analysis. OTUs were clustered at 97% sequence similarity [110], while zOTUs were calculated using UNOISE 2 [113] from the USEARCH 11 package [114]. Only those OTUs and zOTUs occurring with at least 0.25% relative abundance in at least one sample were kept for further analysis. Taxonomy was assigned at an 80% confidence level with SILVA [115]. Following the processing on the IMNGS platform, samples with a read count lower than 10,000 were excluded from subsequent analysis (Supplementary Figure S6). Thereafter, IMNGS steps were repeated with the parameters described above. Afterward, the data provided by IMNGS were refined by editing the phylogenetic tree and taxonomy using SILVA [115]. Sequences were aligned anew, and phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining method available on the software MEGA-X version 10.1.8 [116]. Taxonomy, which was available only at kingdom, phylum, class, or order level was confirmed using the 16S-based ID provided by EzBioCloud and if possible adapted [40]. All mentioned molecular strains (zOTUs) were compared to the EzBioCloud-database and strain similarity based on the variations on sequence level is indicated in brackets behind the corresponding zOTU. Moreover, the taxonomy was revised according to the nomenclature provided by the LPNS database [117] using the phylum names introduced in 2021 [118]. Since this leads to a renaming of all phyla occurring in this study, the former names are given in parentheses. All downstream analyses were carried out using Rhea [119], a modular pipeline for microbial profiling of 16S rRNA gene amplicon sequencing data in an R programming environment (R 3.6.3, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) as described previously [119]. The pipeline is available on the GitHub repository (<https://github.com/Lagkouvardos/Rhea>; accessed on 25 August 2022). The OTU and zOTU tables of all experimental samples can be found in the Supplementary Material (Supplementary Tables S1 and S2). For the α -diversity, the effective richness (i.e., effective number of species) and the effective Shannon diversity were calculated using OTUs [120]. All further parameters were calculated using zOTUs. Based on generalized UniFrac distances, β -diversity was calculated [121]. p values were corrected for multiple testing using the Benjamini–Hochberg method [122]. For statistical testing, taxa with a prevalence equal to or more than 20% (proportion of samples positive for the respective taxa) in at least one

of the groups and a relative abundance of equal to or more than 0.25% were considered. For multiple groups, a Kruskal–Wallis rank sum test was applied. Afterward, the Wilcoxon rank sum test was used for pairwise comparisons. A non-linear Fisher exact test was used to determine the differences between samples with a low prevalence. Data were visualized using Illustrator CS6 version 16.0.0 (Adobe Inc., San José, CA, USA). The most abundant taxa were visualized using the software Prism, version 2010 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The dendrogram was designed using the free available webserver Evolview v3 [123]. Concerning the mock community, it seemed that the exclusion of the mock community had a detrimental effect on low abundant pathogenic bacteria. Without the mock community in the final analysis, the abundance cutoff value shifted in such way that especially *Borrelia* spp. were no longer displayed in the samples. Consequently, we again included the mock community in final analysis as we recommended above for studies using ticks.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24021100/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, R.K.S., S.U., J.W. and A.W.; methodology, L.C.-D., S.H., J.W. and A.W.; software, A.W.; validation, J.W.; formal analysis, J.W. and A.W.; investigation, S.H. and A.W.; resources, R.K.S.; data curation, A.W.; writing—original draft preparation, A.W.; writing—review and editing, R.K.S., S.U. and J.W.; visualization, J.W. and A.W.; supervision, R.K.S., S.U. and J.W.; project administration, R.K.S. and S.U. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available in the Sequence Read Archive under the reference number PRJNA908769.

Acknowledgments: The authors are very thankful for the people supporting the tick collection. Special thanks go to Bettina Wiesinger, who was responsible for tick collection in Traunstein. Further, the aid from Katharina Keiz, Katharina Lang, Katharina Tribelhorn, Cornelia Bröckl, Eva Bengler, Axel Groß, Pia Pickelmann, Anna Eschenlauer, and Hermann Knaub were greatly appreciated. The advice provided by Paul Muschler in establishing the DNA isolation method was very helpful. Discussions regarding bioinformatic analysis and interpretation of data with Ilias Lagkouvardos were a big support. The permission for using and the disposal of the high-resolution stereomicroscope kindly funded to Sebastian Ulrich by the Brigitte und Wolfram Gedek-Stiftung was highly appreciated.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Jongejan, F.; Uilenberg, G. The global importance of ticks. *Parasitology* **2004**, *129*, S3–S14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Sonenshine, D.E.; Roe, R.M. *Biology of Tick*; Oxford University Press: Oxford, UK, 2014; Volume 2.
3. Macleod, J. *Ixodes ricinus* in Relation to its Physical Environment: IV. An Analysis of the Ecological Complexes Controlling Distribution and Activities. *Parasitology* **1936**, *28*, 295–319. [[CrossRef](#)]
4. Perret, J.L.; Guigoz, E.; Rais, O.; Gern, L. Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasitol. Res.* **2000**, *86*, 554–557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Brugger, K.; Walter, M.; Chitimia-Dobler, L.; Dobler, G.; Rubel, F. Seasonal cycles of the TBE and Lyme borreliosis vector *Ixodes ricinus* modelled with time-lagged and interval-averaged predictors. *Exp. Appl. Acarol.* **2017**, *73*, 439–450. [[CrossRef](#)]
6. Belozеров, V. Diapause and biological rhythms in ticks. In *Physiology of Ticks*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1982; pp. 469–500.
7. Dautel, H.; Dippel, C.; Kämmer, D.; Werkhausen, A.; Kahl, O. Winter activity of *Ixodes ricinus* in a Berlin forest. *Int. J. Med. Microbiol.* **2008**, *298*, 50–54. [[CrossRef](#)]
8. Lindsay, L.R.; Barker, I.K.; Surgeoner, G.A.; McEwen, S.A.; Gillespie, T.J.; Robinson, J.T. Survival and Development of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) Under Various Climatic Conditions in Ontario, Canada. *J. Med. Entomol.* **1995**, *32*, 143–152. [[CrossRef](#)]
9. Intergovernmental Panel on Climate Change. *Climate Change 2007—The Physical Science Basis*; Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC): Geneva, Switzerland, 2007.
10. Gray, J.; Kahl, O.; Zintl, A. What do we still need to know about *Ixodes ricinus*? *Ticks Tick Borne Dis.* **2021**, *12*, 101682. [[CrossRef](#)]
11. Lindgren, E.; Gustafson, R. Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change. *Lancet* **2001**, *358*, 16–18. [[CrossRef](#)]

12. Wu, J.; Weening, E.H.; Fasje, J.B.; Höök, M.; Skare, J.T. Invasion of Eukaryotic Cells by *Borrelia burgdorferi* Requires β 1 Integrins and Src Kinase Activity. *Infect. Immun.* **2011**, *79*, 1338–1348. [CrossRef]
13. Burgdorfer, W.; Barbour, A.G.; Hayes, S.F.; Benach, J.L.; Grunwaldt, E.; Davis, J.P. Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science* **1982**, *216*, 1317–1319. [CrossRef]
14. Fingerle, V. 2. Epidemiologie. Available online: https://www.lgl.bayern.de/gesundheits/infektionsschutz/infektionskrankheiten_a_z/borreliose/lyme_epidemiologie.htm (accessed on 12 May 2022).
15. Ross Russell, A.L.; Dryden, M.S.; Pinto, A.A.; Lovett, J.K. Lyme disease: Diagnosis and management. *Pract. Neurol.* **2018**, *18*, 455. [CrossRef] [PubMed]
16. Steere, A.C.; Sikand, V.K.; Meurice, F.; Parenti, D.L.; Fikrig, E.; Schoen, R.T.; Nowakowski, J.; Schmid, C.H.; Laukamp, S.; Buscarino, C.; et al. Vaccination against Lyme Disease with Recombinant *Borrelia burgdorferi* Outer-Surface Lipoprotein A with Adjuvant. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *339*, 209–215. [CrossRef] [PubMed]
17. Fingerle, V. 4. Diagnostik. 2008. Available online: https://www.lgl.bayern.de/gesundheits/infektionsschutz/infektionskrankheiten_a_z/borreliose/lyme_diagnostik.htm (accessed on 12 May 2022).
18. Schmidli, J.; Hunziker, T.; Moesli, P.; Schaad, U.B. Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from Joint Fluid Three Months after Treatment of Facial Palsy Due to Lyme Borreliosis. *J. Infect. Dis.* **1988**, *158*, 905–906. [CrossRef] [PubMed]
19. Strle, F.; Cimperman, J.; Maraspin, V.; Jereb, M.; Preac-Mursic, V.; Ružič, E. Azithromycin versus doxycycline for treatment of erythema migrans: Clinical and microbiological findings. *Infection* **1993**, *21*, 83–88. [CrossRef] [PubMed]
20. Shor, S.; Green, C.; Szantyr, B.; Phillips, S.; Liegner, K.; Burrascano, J.; Bransfield, R.; Maloney, E.L. Chronic Lyme Disease: An Evidence-Based Definition by the ILADS Working Group. *Antibiotics* **2019**, *8*, 269. [CrossRef] [PubMed]
21. Fallon, B.A.; Keilp, J.G.; Corbera, K.M.; Petkova, E.; Britton, C.B.; Dwyer, E.; Slavov, L.; Cheng, J.; Dobkin, J.; Nelson, D.R.; et al. A randomized, placebo-controlled trial of repeated IV antibiotic therapy for Lyme encephalopathy. *Neurology* **2008**, *70*, 992–1003. [CrossRef]
22. Klemperer, M.S.; Hu, L.T.; Evans, J.; Schmid, C.H.; Johnson, G.M.; Trevino, R.P.; Norton, D.; Levy, L.; Wall, D.; McCall, J.; et al. Two Controlled Trials of Antibiotic Treatment in Patients with Persistent Symptoms and a History of Lyme Disease. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *345*, 85–92. [CrossRef]
23. Narasimhan, S.; Fikrig, E. Tick microbiome: The force within. *Trends Parasitol.* **2015**, *31*, 315–323. [CrossRef]
24. Berg, G.; Rybakova, D.; Fischer, D.; Cernava, T.; Vergès, M.-C.C.; Charles, T.; Chen, X.; Cocolin, L.; Eversole, K.; Corral, G.H.; et al. Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. *Microbiome* **2020**, *8*, 103. [CrossRef]
25. Stubbendieck, R.M.; Vargas-Bautista, C.; Straight, P.D. Bacterial Communities: Interactions to Scale. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1234. [CrossRef]
26. Ahantari, A.; Trinachartvanit, W.; Baimai, V.; Grubhoffer, L. Hard ticks and their bacterial endosymbionts (or would be pathogens). *Folia Microbiol.* **2013**, *58*, 419–428. [CrossRef] [PubMed]
27. Narasimhan, S.; Rajeevan, N.; Liu, L.; Zhao, Y.O.; Heisig, J.; Pan, J.; Eppler-Epstein, R.; Deponte, K.; Fish, D.; Fikrig, E. Gut Microbiota of the Tick Vector *Ixodes scapularis* Modulate Colonization of the Lyme Disease Spirochete. *Cell Host Microbe* **2014**, *15*, 58–71. [CrossRef] [PubMed]
28. Hom, E.F.Y.; Penn, A.S. Symbiosis and the Anthropocene. *Symbiosis* **2021**, *84*, 239–270. [CrossRef]
29. Aivelo, T.; Norberg, A.; Tschirren, B. Bacterial microbiota composition of *Ixodes ricinus* ticks: The role of environmental variation, tick characteristics and microbial interactions. *PeerJ* **2019**, *7*, e8217. [CrossRef]
30. Krawczyk, A.I.; Röttgers, L.; Fonville, M.; Takumi, K.; Takken, W.; Faust, K.; Sprong, H. Quantitative microbial population study reveals geographical differences in bacterial symbionts of *Ixodes ricinus*. *Microbiome* **2022**, *10*, 120. [CrossRef] [PubMed]
31. Guizzo, M.G.; Dolezelikova, K.; Neupane, S.; Frantova, H.; Hrbatova, A.; Pafco, B.; Fiorotti, J.; Kopacek, P.; Zurek, L. Characterization and manipulation of the bacterial community in the midgut of *Ixodes ricinus*. *Parasites Vectors* **2022**, *15*, 248. [CrossRef]
32. Portillo, A.; Palomar, A.M.; de Toro, M.; Santibanez, S.; Santibanez, P.; Oteo, J.A. Exploring the bacteriome in anthropophilic ticks: To investigate the vectors for diagnosis. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0213384. [CrossRef]
33. Lambert, J.S.; Cook, M.J.; Healy, J.E.; Murtagh, R.; Avramovic, G.; Lee, S.H. Metagenomic 16S rRNA gene sequencing survey of *Borrelia* species in Irish samples of *Ixodes ricinus* ticks. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0209881. [CrossRef]
34. Ross, B.D.; Hayes, B.; Radey, M.C.; Lee, X.; Josek, T.; Bjork, J.; Neitzel, D.; Paskewitz, S.; Chou, S.; Mougous, J.D. *Ixodes scapularis* does not harbor a stable midgut microbiome. *ISME J.* **2018**, *12*, 2596–2607. [CrossRef]
35. Hoffmann, A.; Müller, T.; Fingerle, V.; Noll, M. Presence of Human Pathogens of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato Complex Shifts the Sequence Read Abundances of Tick Microbiomes in Two German Locations. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1814. [CrossRef]
36. Garcia-Vozmediano, A.; Tomassone, L.; Fonville, M.; Bertolotti, L.; Heylen, D.; Fabri, N.D.; Medlock, J.M.; Nijhof, A.M.; Hansford, K.M.; Sprong, H.; et al. The Genetic Diversity of Rickettsiella Symbionts in *Ixodes ricinus* Throughout Europe. *Microb. Ecol.* **2022**, *84*, 613–626. [CrossRef] [PubMed]
37. Stach, J.E.M.; Maldonado, L.A.; Ward, A.C.; Bull, A.T.; Goodfellow, M. *Williamsia maris* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Sea of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2004**, *54*, 191–194. [CrossRef]
38. Gundlapally, S.R.; Garcia-Pichel, F. The community and phylogenetic diversity of biological soil crusts in the Colorado Plateau studied by molecular fingerprinting and intensive cultivation. *Microb. Ecol.* **2006**, *52*, 345–357. [CrossRef]
39. Bian, D.R.; Xue, H.; Piao, C.G.; Li, Y. *Stenotrophomonas cyclobalanopsis* sp. nov., isolated from the leaf spot disease of *Cyclobalanopsis patelliformis*. *Antonie Leeuwenhoek* **2020**, *113*, 1447–1454. [CrossRef] [PubMed]

40. Yoon, S.-H.; Ha, S.-M.; Kwon, S.; Lim, J.; Kim, Y.; Seo, H.; Chun, J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2017**, *67*, 1613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Johnson, J.S.; Spakowicz, D.J.; Hong, B.-Y.; Petersen, L.M.; Demkowicz, P.; Chen, L.; Leopold, S.R.; Hanson, B.M.; Agresta, H.O.; Gerstein, M.; et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 5029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Hoffmann, A.; Fingerle, V.; Noll, M. Analysis of Tick Surface Decontamination Methods. *Microorganisms* **2020**, *8*, 987. [[CrossRef](#)]
43. Amar, Y.; Lagkouvardos, I.; Silva, R.L.; Ishola, O.A.; Foessel, B.U.; Kublik, S.; Scholer, A.; Niedermeier, S.; Bleuel, R.; Zink, A.; et al. Pre-digest of unprotected DNA by Benzonase improves the representation of living skin bacteria and efficiently depletes host DNA. *Microbiome* **2021**, *9*, 123. [[CrossRef](#)]
44. Borde, J.P.; Glaser, R.; Braun, K.; Riach, N.; Hologa, R.; Kaier, K.; Chitimia-Dobler, L.; Dobler, G. Decoding the Geography of Natural TBEV Microfoci in Germany: A Geostatistical Approach Based on Land-Use Patterns and Climatological Conditions. *Int. J. Environ. Health Res.* **2022**, *19*, 11830. [[CrossRef](#)]
45. Gall, C.A.; Reif, K.E.; Scoles, G.A.; Mason, K.L.; Mousel, M.; Noh, S.M.; Brayton, K.A. The bacterial microbiome of *Dermacentor andersoni* ticks influences pathogen susceptibility. *ISME J.* **2016**, *10*, 1846–1855. [[CrossRef](#)]
46. Kämpfer, P.; Lodders, N.; Falsen, E. *Luteibacter anthropi* sp. nov., isolated from human blood, and reclassification of *Dyella yeojiensis* Kim et al. 2006 as *Luteibacter yeojiensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2009**, *59*, 2884–2887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Akter, S.; Huq, M.A. *Luteibacter pinisoli* sp. nov., a casein degrading bacterium isolated from rhizospheric soil of *Pinus koraiensis*. *Arch. Microbiol.* **2018**, *200*, 1017–1023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Guglielmetti, S.; Basilico, R.; Taverniti, V.; Arioli, S.; Piagnani, C.; Bernacchi, A. *Luteibacter rhizovicinus* MIMR1 promotes root development in barley (*Hordeum vulgare* L.) under laboratory conditions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *29*, 2025–2032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Satola, B.; Wübbeler, J.H.; Steinbüchel, A. Metabolic characteristics of the species *Variovorax paradoxus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 541–560. [[CrossRef](#)]
50. Tani, A.; Sahin, N. *Methylobacterium haplocladii* sp. nov. and *Methylobacterium brachythecii* sp. nov., isolated from bryophytes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2013**, *63*, 3287–3292. [[CrossRef](#)]
51. Weber, M.; Schünemann, W.; Fuß, J.; Kämpfer, P.; Lipski, A. *Stenotrophomonas lactitubi* sp. nov. and *Stenotrophomonas indicatrix* sp. nov., isolated from surfaces with food contact. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2018**, *68*, 1830–1838. [[CrossRef](#)]
52. Jeong, J.J.; Lee, Y.J.; Pathiraja, D.; Park, B.; Choi, I.G.; Kim, K.D. Draft Genome Sequences of *Chryseobacterium lactis* NCTC11390(T) Isolated from Milk, *Chryseobacterium oncorhynchi* 701B-08(T) from Rainbow Trout, and *Chryseobacterium viscerum* 687B-08(T) from Diseased Fish. *Genome Announc.* **2018**, *6*, e00628-18. [[CrossRef](#)]
53. Kämpfer, P.; McInroy, J.A.; Glaeser, S.P. *Chryseobacterium rhizoplanae* sp. nov., isolated from the rhizosphere environment. *Antonie Leeuwenhoek* **2015**, *107*, 533–538. [[CrossRef](#)]
54. Venil, C.K.; Nordin, N.; Zakaria, Z.A.; Ahmad, W.A. *Chryseobacterium artocarpi* sp. nov., isolated from the rhizosphere soil of *Artocarpus integer*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2014**, *64*, 3153–3159. [[CrossRef](#)]
55. Gómez-Ramírez, M.; Montero-Álvarez, L.A.; Tobón-Avilés, A.; Fierros-Romero, G.; Rojas-Avelizapa, N.G. *Microbacterium oxydans* and *Microbacterium liquefaciens*: A biological alternative for the treatment of Ni-V-containing wastes. *J. Environ. Sci. Health Part A Toxic Hazard. Subst. Environ. Eng.* **2015**, *50*, 602–610. [[CrossRef](#)]
56. Frost, V.J.; Westover, K.M. Complete Genome Sequences of *Microbacterium liquefaciens* Phages Mercedes, Leafus, Nebulous, and Ixel. *Microbiol. Resour. Annot.* **2021**, *10*, e00068-21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Colovas, J.; Bintarti, A.F.; Mehan Llontop, M.E.; Grady, K.L.; Shade, A. Do-it-Yourself Mock Community Standard for Multi-Step Assessment of Microbiome Protocols. *Curr. Protoc.* **2022**, *2*, e533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Abellan-Schneyder, I.; Machado, M.S.; Reitmeier, S.; Sommer, A.; Sewald, Z.; Baumbach, J.; List, M.; Neuhaus, K. Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. *mSphere* **2021**, *6*, e01202-20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Najm, N.A.; Silaghi, C.; Bell-Sakyi, L.; Pfister, K.; Passos, L.M. Detection of bacteria related to *Candidatus* Midichloria mitochondrii in tick cell lines. *Parasitol. Res.* **2012**, *110*, 437–442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Sasser, D.; Beninati, T.; Bandi, C.; Bouman, E.A.P.; Sacchi, L.; Fabbri, M.; Lo, N. ‘*Candidatus* Midichloria mitochondrii’, an endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2006**, *56*, 2535–2540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Sasser, D.; Lo, N.; Epis, S.; D’Auria, G.; Montagna, M.; Comandatore, F.; Horner, D.; Peretó, J.; Luciano, A.M.; Franciosi, F.; et al. Phylogenomic Evidence for the Presence of a Flagellum and *cbb3* Oxidase in the Free-Living Mitochondrial Ancestor. *Mol. Biol. Evol.* **2011**, *28*, 3285–3296. [[CrossRef](#)]
62. Lo, N.; Beninati, T.; Sasser, D.; Bouman, E.A.P.; Santagati, S.; Gern, L.; Sambri, V.; Masuzawa, T.; Gray, J.S.; Jaenson, T.G.T.; et al. Widespread distribution and high prevalence of an alpha-proteobacterial symbiont in the tick *Ixodes ricinus*. *Environ. Microbiol.* **2006**, *8*, 1280–1287. [[CrossRef](#)]
63. Comandatore, F.; Radaelli, G.; Montante, S.; Sacchi, L.; Clementi, E.; Epis, S.; Cafiso, A.; Serra, V.; Pajoro, M.; Di Carlo, D.; et al. Modeling the Life Cycle of the Intramitochondrial Bacterium ‘*Candidatus* Midichloria mitochondrii’ Using Electron Microscopy Data. *mBio* **2021**, *12*, e0057421. [[CrossRef](#)]
64. Anstead, C.A.; Chilton, N.B. Discovery of novel *Rickettsiella* spp. in ixodid ticks from Western Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 1403–1410. [[CrossRef](#)]

65. Kurtti, T.J.; Palmer, A.T.; Oliver, J.H. Rickettsiella-like Bacteria in *Ixodes woodi* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* **2002**, *39*, 534–540. [[CrossRef](#)]
66. Tsuchida, T.; Koga, R.; Horikawa, M.; Tsunoda, T.; Maoka, T.; Matsumoto, S.; Simon, J.C.; Fukatsu, T. Symbiotic bacterium modifies aphid body color. *Science* **2010**, *330*, 1102–1104. [[CrossRef](#)]
67. Tully, J.G.; Rose, D.L.; Yunker, C.E.; Carle, P.; Bové, J.M.; Williamson, D.L.; Whitcomb, R.F. *Spiroplasma ixodetis* sp. nov., a New Species from *Ixodes pacificus* Ticks Collected in Oregon. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **1995**, *45*, 23–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Henning, K.; Greiner-Fischer, S.; Hotzel, H.; Ebsen, M.; Theegarten, D. Isolation of *Spiroplasma* sp. from an Ixodes tick. *Int. J. Med. Microbiol.* **2006**, *296*, 157–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Bell-Sakyi, L.; Palomar, A.M.; Kazimirova, M. Isolation and propagation of a *Spiroplasma* sp. from Slovakian *Ixodes ricinus* ticks in *Ixodes* spp. cell lines. *Ticks Tick Borne Dis.* **2015**, *6*, 601–606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Eimer, J.; Fernström, L.; Rohlén, L.; Grankvist, A.; Loo, K.; Nyman, E.; Henningson, A.; Haglund, M.; Hultqvist, V.; Sjöwall, J.; et al. *Spiroplasma ixodetis* Infections in Immunocompetent and Immunosuppressed Patients after Tick Exposure, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.* **2022**, *28*, 1681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Cisak, E.; Wójcik-Fatla, A.; Zając, V.; Sawczyn, A.; Sroka, J.; Dutkiewicz, J. Spiroplasma—An emerging arthropod-borne pathogen? *Ann. Agric. Environ. Med.* **2015**, *22*, 589–593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Clark, H.F. Suckling mouse cataract agent. *J. Infect. Dis.* **1964**, *114*, 476–487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Farassat, N.; Reich, M.; Serr, A.; Küchlin, S.; Ervemi, M.; Auw-Hädrich, C.; Krastel, H.; Lagrèze, W.A. Spiroplasma species as a rare cause of congenital cataract and uveitis: A case series. *BMC Ophthalmol.* **2021**, *21*, 434. [[CrossRef](#)]
74. Bastian, F.O. The Case for Involvement of Spiroplasma in the Pathogenesis of Transmissible Spongiform Encephalopathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2014**, *73*, 104–114. [[CrossRef](#)]
75. Wilking, H.; Fingerle, V.; Klier, C.; Thamm, M.; Stark, K. Antibodies against *Borrelia burgdorferi* sensu lato among Adults, Germany, 2008–2011. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 107–110. [[CrossRef](#)]
76. Töpfer, K.H.; Straubinger, R.K. Characterization of the humoral immune response in dogs after vaccination against the Lyme borreliosis agent a study with five commercial vaccines using two different vaccination schedules. *Vaccine* **2007**, *25*, 314–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Springer, A.; Raulf, M.K.; Fingerle, V.; Strube, C. Borrelia prevalence and species distribution in ticks removed from humans in Germany, 2013–2017. *Ticks Tick Borne Dis.* **2020**, *11*, 101363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Zubriková, D.; Wittmann, M.; Höhnig, V.; Švec, P.; Vichová, B.; Essbauer, S.; Dobler, G.; Grubhoffer, L.; Pfister, K. Prevalence of tick-borne encephalitis virus and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks in Lower Bavaria and Upper Palatinate, Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* **2020**, *11*, 101375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Burgdorfer, W.; Barbour, A.G.; Hayes, S.F.; Péter, O.; Aeschlimann, A. *Ixodes ricinus*: Vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. *Acta Trop.* **1979**, *36*, 357–367. [[PubMed](#)]
80. Beati, L.; Péter, O.; Burgdorfer, W.; Aeschlimann, A.; Raoult, D. Confirmation that *Rickettsia helvetica* sp. nov. Is a Distinct Species of the Spotted Fever Group of Rickettsiae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **1993**, *43*, 521–526. [[CrossRef](#)]
81. Boretti, F.S.; Perreten, A.; Meli, M.L.; Cattori, V.; Willi, B.; Wengi, N.; Hornok, S.; Honegger, H.; Hegglin, D.; Woelfel, R.; et al. Molecular Investigations of *Rickettsia helvetica* infection in dogs, foxes, humans, and Ixodes ticks. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 3230–3237. [[CrossRef](#)]
82. Nilsson, K.; Elfving, K.; Pahlson, C. *Rickettsia helvetica* in patient with meningitis, Sweden, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 490–492. [[CrossRef](#)]
83. Oteo, J.A.; Portillo, A. Tick-borne rickettsioses in Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* **2012**, *3*, 271–278. [[CrossRef](#)]
84. Kagemann, J.; Clay, K. Effects of infection by *Arsenophonus* and *Rickettsia* bacteria on the locomotive ability of the ticks *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*, and *Ixodes scapularis*. *J. Med. Entomol.* **2013**, *50*, 155–162. [[CrossRef](#)]
85. Wächter, M.; Wölfel, S.; Pfeffer, M.; Dobler, G.; Kohn, B.; Moritz, A.; Pachnicke, S.; Silaghi, C. Serological differentiation of antibodies against *Rickettsia helvetica*, *R. raoultii*, *R. slovacica*, *R. monacensis* and *R. felis* in dogs from Germany by a micro-immunofluorescent antibody test. *Parasites Vectors* **2015**, *8*, 126. [[CrossRef](#)]
86. Wölfel, R.; Terzioglu, R.; Kiessling, J.; Wilhelm, S.; Essbauer, S.; Pfeffer, M.; Dobler, G. *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* Ticks in Bavaria, Germany. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1078*, 509–511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Knoll, S.; Springer, A.; Hauck, D.; Schunack, B.; Pachnicke, S.; Strube, C. Regional, seasonal, biennial and landscape-associated distribution of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. infections in Ixodes ticks in northern Germany and implications for risk assessment at larger spatial scales. *Ticks Tick Borne Dis.* **2021**, *12*, 101657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Tappe, J.; Strube, C. *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. infections in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the city of Hanover (Germany): Revisited. *Ticks Tick Borne Dis.* **2013**, *4*, 432–438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Kawahara, M.; Rikihisa, Y.; Isogai, E.; Takahashi, M.; Misumi, H.; Suto, C.; Shibata, S.; Zhang, C.; Tsuji, M. Ultrastructure and phylogenetic analysis of ‘*Candidatus Neohrlichia mikurensis*’ in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2004**, *54*, 1837–1843. [[CrossRef](#)]
90. Schouls, L.M.; Pol, I.V.D.; Rijpkema, S.G.T.; Schot, C.S. Detection and Identification of Ehrlichia, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and Bartonella Species in Dutch *Ixodes ricinus* Ticks. *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37*, 2215–2222. [[CrossRef](#)]
91. Pan, H.; Liu, S.; Ma, Y.; Tong, S.; Sun, Y. Ehrlichia-like Organism Gene Found in Small Mammals in the Suburban District of Guangzhou of China. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2003**, *990*, 107–111. [[CrossRef](#)]

92. Silaghi, C.; Woll, D.; Mahling, M.; Pfister, K.; Pfeffer, M. *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis in rodents in an area with sympatric existence of the hard ticks *Ixodes ricinus* and Dermacentor reticulatus, Germany. *Parasites Vectors* **2012**, *5*, 285. [CrossRef]
93. Loewenich, F.D.V.; Geißdörfer, W.; Disqué, C.; Matten, J.; Schett, G.; Sakka, S.G.; Bogdan, C. Detection of *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis; in Two Patients with Severe Febrile Illnesses: Evidence for a European Sequence Variant. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 2630–2635. [CrossRef]
94. Welinder-Olsson, C.; Kjellin, E.; Vaht, K.; Jacobsson, S.; Wennerås, C. First Case of Human *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis; Infection in a Febrile Patient with Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 1956–1959. [CrossRef]
95. Fehr, J.S.; Bloemberg, G.V.; Ritter, C.; Hombach, M.; Lüscher, T.F.; Weber, R.; Keller, P.M. Septicemia caused by tick-borne bacterial pathogen *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 1127–1129. [CrossRef]
96. Diniz, P.P.V.P.; Schulz, B.S.; Hartmann, K.; Breitschwerdt, E.B. *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis; Infection in a Dog from Germany. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 2059–2062. [CrossRef] [PubMed]
97. Glatz, M.; Müllegger, R.R.; Maurer, F.; Fingerle, V.; Achermann, Y.; Wilske, B.; Bloemberg, G.V. Detection of *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis, *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies and *Anaplasma phagocytophilum* in a tick population from Austria. *Ticks Tick Borne Dis.* **2014**, *5*, 139–144. [CrossRef] [PubMed]
98. Macleod, J.; Gordon, W.S. Studies in Tick-borne Fever of Sheep. I. Transmission by the Tick, *Ixodes ricinus*, with a Description of the Disease Produced. *Parasitology* **1933**, *25*, 273–283. [CrossRef]
99. Foggie, A. Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep. *J. Pathol. Bacteriol.* **1951**, *63*, 1–15. [CrossRef]
100. Dumler, J.S.; Barbet, A.F.; Bekker, C.P.; Dasch, G.A.; Palmer, G.H.; Ray, S.C.; Rikihisa, Y.; Rurangirwa, F.R. 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.* **2001**, *51*, 2145–2165. [CrossRef]
101. May, K.; Strube, C. Prevalence of Rickettsiales (*Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp.) in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the city of Hamburg, Germany. *Parasitol. Res.* **2014**, *113*, 2169–2175. [CrossRef]
102. Schorn, S.; Pfister, K.; Reulen, H.; Mahling, M.; Manitz, J.; Thiel, C.; Silaghi, C. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* **2011**, *2*, 196–203. [CrossRef]
103. Kohn, B.; Silaghi, C.; Galke, D.; Arndt, G.; Pfister, K. Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Res. Vet. Sci.* **2011**, *91*, 71–76. [CrossRef]
104. Kowalski, J.; Hopfenmüller, W.; Fingerle, V.; Malberg, H.; Eisenblätter, M.; Wagner, J.; Miksits, K.; Hahn, H.; Ignatius, R. Seroprevalence of human granulocytic anaplasmosis in Berlin Brandenburg, Germany: An 8-year survey. *Clin. Microbiol. Infect.* **2006**, *12*, 924–927. [CrossRef]
105. Timcke, M.-L.; Pätzold, A.; Wendler, D.; Flik, I.; Möller, C.; Vollnhals, S.; Eckwert, L. Wo Sich Zecken in Deutschland festsaugen. Available online: <https://interaktiv.abendblatt.de/zecken-atlas-deutschland/> (accessed on 25 October 2022).
106. Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A.; Lane, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 697–703. [CrossRef]
107. Berry, D.; Ben Mahfoudh, K.; Wagner, M.; Loy, A. Barcoded Primers Used in Multiplex Amplicon Pyrosequencing Bias Amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 7846–7849. [CrossRef] [PubMed]
108. Lagkouvardos, I.; Kläring, K.; Heinzmann, S.S.; Platz, S.; Scholz, B.; Engel, K.H.; Schmitt-Kopplin, P.; Haller, D.; Rohn, S.; Skurk, T. Gut metabolites and bacterial community networks during a pilot intervention study with flaxseeds in healthy adult men. *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, *59*, 1614–1628. [CrossRef] [PubMed]
109. Andrews, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed on 22 August 2022).
110. Lagkouvardos, I.; Joseph, D.; Kapfhammer, M.; Giritli, S.; Horn, M.; Haller, D.; Clavel, T.J.S.R. IMGs: A comprehensive open resource of processed 16S rRNA microbial profiles for ecology and diversity studies. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33721. [CrossRef] [PubMed]
111. Edgar, R.C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* **2013**, *10*, 996–998. [CrossRef] [PubMed]
112. Edgar, R.C.; Haas, B.J.; Clemente, J.C.; Quince, C.; Knight, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 2194–2200. [CrossRef]
113. Edgar, R.C. UNOISE2: Improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *bioRxiv* **2016**. bioRxiv:081257.
114. Edgar, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 2460–2461. [CrossRef]
115. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *41*, D590–D596. [CrossRef]
116. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1870–1874. [CrossRef]
117. Parte, A.C.; Carbasse, J.S.; Meier-Kolthoff, J.P.; Reimer, L.C.; Göker, M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**, *70*, 5607. [CrossRef]
118. Oren, A.; Garrity, G.M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2021**, *71*, 005056. [CrossRef] [PubMed]

119. Lagkouvardos, I.; Fischer, S.; Kumar, N.; Clavel, T.J.P. Rhea: A transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. *PeerJ* **2017**, *5*, e2836. [[CrossRef](#)]
120. Jost, L. Partitioning diversity into independent alpha and beta components. *Ecology* **2007**, *88*, 2427–2439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Chen, J.; Bittinger, K.; Charlson, E.S.; Hoffmann, C.; Lewis, J.; Wu, G.D.; Collman, R.G.; Bushman, F.D.; Li, H. Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 2106–2113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* **1995**, *57*, 289–300. [[CrossRef](#)]
123. Subramanian, B.; Gao, S.; Lercher, M.J.; Hu, S.; Chen, W.H. Evolvview v3: A webserver for visualization, annotation, and management of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W270–W275. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

IV. DISKUSSION

1 Besonderheiten bei der Sequenzierung von Zeckenproben

Zeckenproben zeigen sich für die Vorbereitung einer Mikrobiomanalyse als herausfordernd. Denn Zecken werden meist mit der Flag-Methode aus der Umwelt entnommen (CLYMER *et al.*, 1970; GINSBERG & EWING, 1989; DANTAS-TORRES *et al.*, 2013). Abhängig von der Fragestellung gibt es Methoden, durch eine Oberflächendekontamination bei Zeckenproben eine mögliche bakterielle und mykologische Kontamination der Zeckenoberfläche aus der Umwelt zu reduzieren (HOFFMANN *et al.*, 2020). Ziel dieser Behandlung ist es, nur die Mikrobiota zu sequenzieren, die auch mit der Zecke interagiert (FERNÁNDEZ-RUIZ *et al.*, 2023). Als Goldstandard wird die Anwendung von Bleichmitteln beschrieben (BINETRUY *et al.*, 2019). Allerdings kann dabei die interne Mikrobiota der Zecken beeinflusst werden, denn die Anwendung von Bleichmittel wie z. B. 1 %iges NaClO führte zu signifikanten Veränderungen der *read*-Anzahl von bakteriellen Genera wie *Coxiella* spp. und *Borrelia* spp. (FERNÁNDEZ-RUIZ *et al.*, 2023).

Die Anwender dieser Arbeit haben sich gezielt gegen eine solche Oberflächenbehandlung entschieden. Es stellt sich die Frage, ob es generell zielführend ist, die kutikuläre Mikrobiota abzuwaschen. Zumal die externe Mikrobiota der Zecke wichtige Funktionen ähnlich einem humanen Hautmikrobiom übernehmen könnte und ebenfalls an der Physiologie der Zecke beteiligt sein kann. Des Weiteren kann man nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft nur sehr schwer unterscheiden, welche Teile der externen Mikrobiota eine Rolle in der Zeckenbiologie übernehmen und bei welchen Teilen es sich tatsächlich um eine Umweltkontamination handelt. Noch ist nicht bekannt, welchen Einfluss das externe Mikrobiom der Zecke auf den Gesamtorganismus hat. Die Reproduktion der weiblichen Zecken scheint durch die Oberflächendekontamination allerdings nicht beeinflusst zu werden (FERNÁNDEZ-RUIZ *et al.*, 2023).

Einzelne Zeckenproben, aber auch Nymphen und insbesondere einzelne Zeckenorgane besitzen eine sehr geringe Biomasse. Verunreinigungen mit kontaminierter DNA und Kreuzkontamination sind in diesen Proben

wahrscheinlicher als in Proben mit einem höheren Anteil bakteriellen DNA aus der kommensalen Mikrobiota (SALTER *et al.*, 2014; EISENHOFER *et al.*, 2019). Eine mögliche Abhilfe ist die gängige Methode des Proben-Poolings bei Zeckenproben, um den Einsatz der Biomasse zu erhöhen (CARPI *et al.*, 2011; TOKARZ *et al.*, 2019; PERVEEN *et al.*, 2022). Allerdings muss damit ein Kompromiss mit der Gefahr der Verschleierung der Ergebnisse einzelner Proben aufgrund des Verdünnungseffekts eingegangen werden, da die Mikrobiota oder eine spezielle Kontamination nicht mehr auf die einzelne Probe zurückgeführt werden kann (KRAWCZYK *et al.*, 2022). Außerdem steigt die Gefahr der falsch-positiv sowie der falsch-negativ Rate je nach Größe des Probenpools in Bezug auf gering vorkommende Infektionserreger (GROBE *et al.*, 2021).

Neben den Negativkontrollen, mit denen vor allem die Chemikalien und die Arbeitsschritte während der DNA-Isolation auf mögliche Prozesskontaminationen überprüft werden (EISENHOFER *et al.*, 2019; QIAN *et al.*, 2020), ist die Erstellung einer Positivkontrolle in Form einer *mock community* bei Mikrobiomstudien empfehlenswert (ABELLAN-SCHNEYDER *et al.*, 2021; TOURLOUSSE *et al.*, 2022). Sie definiert eine artifiziell hergestellte Probe und beinhaltet mikrobielle Zellen und/oder Viren oder bereits isolierte DNA, die im Fokus der jeweiligen Mikrobiomstudie stehen (HIGHLANDER, 2014). So wird die Zusammensetzung einer Mikrobiomprobe imitiert. Die *mock community* dient dazu, den Erfolg und mögliche Verzerrungen der labortechnischen und vor allem bioinformatischen Methoden auf der Grundlage einer bekannten, einfachen Probe zu ermitteln (KARSTENS *et al.*, 2019; ABELLAN-SCHNEYDER *et al.*, 2021; COLOVAS *et al.*, 2022). In Bezug auf Zeckenproben konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Einsatz einer *mock community* vor allem für die Bioinformatik von Bedeutung ist. Sie ermöglicht eine exakte Identifizierung verschiedener Genera mit geringen Abundanzen, wie Borrelien oder Anaplasmen (WIESINGER *et al.*, 2023). Im Vergleich zu Mikrobiomstudien ohne den Einsatz von definierten *mock communities*, wird die Identität der erhaltenen Genera nur geschätzt, indem sie mit einer Datenbank verglichen wird (WIESINGER *et al.*, 2023). Mit dem Einsatz von *mock communities* kann die Identität dieser Genera sicher bestimmt werden, da ausschließlich bekannte Stämme eingesetzt werden. Darüber hinaus konnten wir feststellen, dass sich die Nichtverwendung der *mock community* bei den finalen bioinformatischen Analysen negativ auf die Prävalenz pathogener OTUs in den

Zeckenproben auswirkte. Ohne *mock community*, die diese pathogenen OTUs in sehr hohen Abundanzen enthielt, wurden z. B. einige Proben als Borrelien-negativ aufgelistet, da sie mit ihrer Abundanz unterhalb des empfohlenen Abundanz-Grenzwertes von 0,25 % lagen. Folglich ist die Verwendung einer *mock community* für eine exakte, bioinformatische Auswertung empfehlenswert.

2 Das Mikrobiom der weiblichen *Ixodes-ricinus*-Zecken

Ziel dieser Arbeit war es, das Mikrobiom von gesamten, adulten, weiblichen *I.-ricinus*-Zecken zu beschreiben. Darüber hinaus wurde die Mikrobiota der Speicheldrüsen, des Mitteldarms und der Überreste charakterisiert, indem weibliche Zecken mithilfe eines Stereomikroskops mit verstellbarer Tiefenschärfe präpariert wurden. Die Präparation von weiblichen Zecken ist eine filigrane Arbeit, die trotz größter Sorgfalt anfällig für eine inexakte Trennung der verschiedenen Gewebe ist. Durch die anatomische Lage der Malpighischen Tubuli können diese nicht immer exakt vom Mitteldarm getrennt werden (SONENSHINE & ROE, 2014). Vor allem an den Speicheldrüsen sind Rückstände von benachbartem Gewebe zu erwarten, zumal sie aufgrund der geringen Größe schwierig zu entnehmen sind und teilweise degeneriert vorliegen (siehe Kapitel 2.2.1.2). Die Degenerationsprozesse der Acinus-Typen 2 und 3 erschweren das Auffinden und die Präparation der noch vorhandenen Speicheldrüsen (HARRIS & KAUFMAN, 1981; BOWMAN & NUTTALL, 2008). In den kompletten Zeckenproben und in den Überrestproben der Zecken traten hauptsächlich OTUs auf, die mit der Umwelt assoziiert sind. Allerdings konnten umweltassoziierte OTUs auch in den Speicheldrüsenproben und zu einem sehr geringen Anteil auch in den Mitteldarmproben nachgewiesen werden. Diese wurde bereits von ROSS *et al.* (2018) beschrieben. In dieser Arbeit zählten dazu Genera wie *Williamsia maris*, *Luteibacter anthropi*, *Variovorax paradoxus*, Beijerinckiaceae, *Methylobacterium haplocladii*, *Sphingomonas desiccabilis*, *Stenotrophomonas lactitubi*, *Chryseobacterium lactis* und *Microbacterium liquefaciens*.

Ein Hauptaugenmerk des Projekts lag auf der Identifizierung und Charakterisierung möglicher Endosymbionten innerhalb der bakteriellen Gemeinschaften der *I.-ricinus*-Zecken. In allen Zeckenproben, mit Ausnahme einer Probe, fanden wir *Candidatus Midichloria mitochondrii* in hohen Abundanzen. Dieses Bakterium könnte eine wesentliche – möglicherweise endosymbiontische – Rolle in der

Physiologie von *I. ricinus*-Zecken übernehmen und damit einen Kandidaten für die Entwicklung einer Bekämpfungsmethode darstellen. Außerdem wurden Endosymbionten, wie *Rickettsiella* spp. (*Rickettsiella popilliae*, *Rickettsiella grylli*, *Rickettsiella viridis* und *Rickettsiella isopodorum*) und *Spiroplasma ixodetis*, nachgewiesen.

2.1 Das Mikrobiom des Mitteldarms

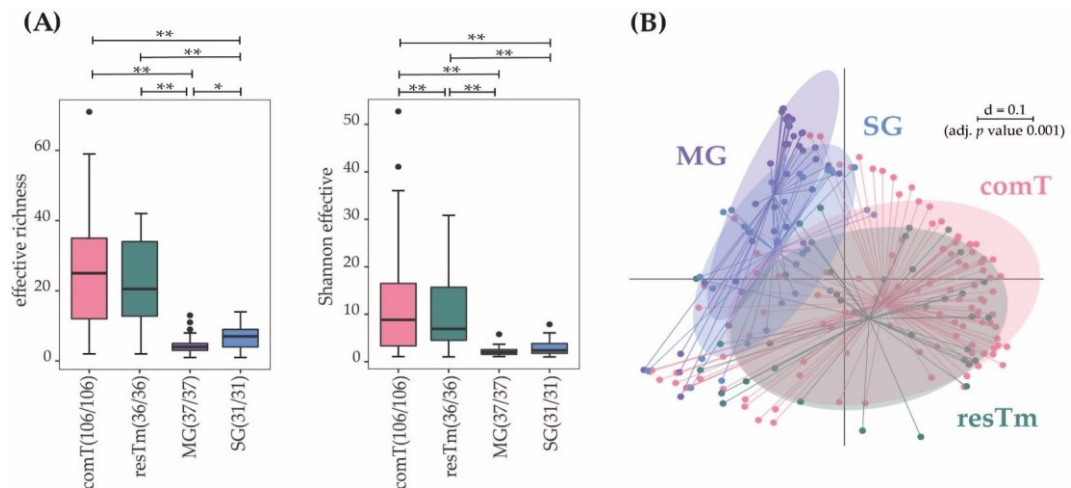


Abbildung 10: α -Diversität und β -Diversität der Zeckenmikrobiomstudie

(A) Die α -Diversität ist mit der *effective richness* und der *Shannon effective* zwischen den verschiedenen Probenarten dargestellt. Die Box-Plots zeigen den Median (schwarzer, dicker Balken), das obere und untere Quartil (innerhalb der Box) und die Standardabweichung (Antennen, Whiskers). Die Ausreißer sind als Punkt dargestellt. Die Klammern oberhalb der Box-Plots stellen die Signifikanzen des Paarvergleichs dar.

(B) Die β -Diversität ist mit den mikrobiellen Profilen der verschiedenen Probenarten in einem MDS-Plot dargestellt. Die Skala ist ein Indikator für die Unterschiede in der phylogenetischen Zusammensetzung der Mikrobiota basierend auf den generalisierten *UniFrac*-Distanzen ($d = 0,1$, 10 % Unterschied)

Komplette, weibliche *Ixodes-ricinus*-Zecken (comT), die Überreste (resTm), der Mitteldarm (MG) und die Speicheldrüsen (SG). *P*-Wert (*p*): * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Nach WIESINGER *et al.* (2023)

Die Zusammensetzung der Mikrobiota des Mitteldarms beeinflusst die Vektorkompetenz der Zecke und ist damit an der Übertragung von Pathogenen beteiligt (GUIZZO *et al.*, 2020). Bei anderen Arthropoden kann das während der Blutmahlzeit aufgenommene Blut die Mikrobiota verändern. Bei *Aedes aegypti* beispielsweise nimmt die Diversität des Mitteldarm-Mikrobioms nach einer Blutmahlzeit zu (GUSMÃO *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Allerdings scheint dies bei Zecken trotz der immensen Gewichtszunahme nicht der Fall zu sein (ROSS *et al.*, 2018; GUIZZO *et al.*, 2020; GUIZZO *et al.*, 2022). Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass der Mitteldarm im Vergleich zu den gesamten Zeckenproben, den Überrestproben und sogar den Speicheldrüsenproben, die geringste Diversität

aufweist (Abbildung 10). In der Literatur gibt es dazu einige Hypothesen. Zum einen scheinen die Hämoglobin-Fragmente aus der Blutverdauung das Mikrobiom des Mitteldarms negativ zu beeinflussen (FOGAÇA *et al.*, 1999; NAKAJIMA *et al.*, 2003; KOPÁCEK *et al.*, 2010), denn sie wirken toxisch auf Bakterien (ANZALDI & SKAAR, 2010). Des Weiteren reguliert die epitheliale Immunität im Zeckendarm die bakterielle Besiedlung durch antimikrobielle Peptide und reaktive Sauerstoffspezies (SONENSHINE & MACALUSO, 2017). Immunitätsgene wie Defensine, Lysozyme und Microplusin werden am Ende der Blutmahlzeit hochreguliert und tragen zu einer reduzierten bakteriellen Diversität bei (PERNER *et al.*, 2016). Weitere Immunitätsfaktoren, die auch auf Bakterien abzielen könnten, regulieren die Blutverdauung (CHOU *et al.*, 2015; PALMER & JIGGINS, 2015). Die digestiven Zeckendarmzellen verdauen das aufgenommene Blut intrazellulär. Es ist sehr wahrscheinlich, dass durch diese intensive Endozytose auch Darmmikrobiota verdaut wird (SOJKA *et al.*, 2013). Das Milieu des Mitteldarms ist ungeeignet für ein Mikrobiom mit hoher Diversität, da es nur mit geringen Mengen an Vitamin B1 (Thiamin) ausgestattet ist (ROSS *et al.*, 2018). Nur einige wenige Bakteriengattungen, wie z. B. Borrelien, können in diesem vitaminarmen Umfeld überleben (ZHANG *et al.*, 2016). Eine limitierte Nährstoffverfügbarkeit und Austrocknungsvorgänge während der Phase abseits des Wirtes (also des längsten Zeitintervalls des Entwicklungszyklus der Zecken) erschweren das Entstehen einer bakteriellen Diversität im Zeckendarm zusätzlich (SONENSHINE & ROE, 2014).

Der Ursprung der Mikrobiota des Darms ist laut GUIZZO *et al.* (2020) die Umwelt. Die detektierten Bakterien sind pflanzenassoziiert, bodenassoziiert oder es handelt sich um kommensale Bakterien der Wirtshaut (NARASIMHAN *et al.*, 2022). Es konnte gezeigt werden, dass Zecken aus dem Feld eine höhere Diversität besitzen als Laborzecken (ZOLNIK *et al.*, 2016; KWAN *et al.*, 2017; GUIZZO *et al.*, 2020). Es bleibt allerdings unklar, ob und in welchem Ausmaß umweltassoziierte Bakterien auch den Mitteldarm besiedeln und ob diese sogar mit pathogenen Bakterien wie Borrelien um Nährstoffe konkurrieren oder Infektionen verhindern können (ROSS *et al.*, 2018). Konkrete Vertreter der Darmmikrobiota von Zecken sind Genera, wie *Spiroplasma* spp., *Escherichia* spp., *Neisseria* spp., *Porphyromonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Ralstonia* spp. und *Pelomonas* spp., und größtenteils abhängig von der Zeckenart (GUIZZO *et al.*,

2020; GUIZZO *et al.*, 2022). Die Hauptvertreter der Darmmikrobiota dieser Arbeit waren vorwiegend Mitglieder folgender Familien: Midichloriaceae, Coxiellaceae, Rickettsiaceae und Spiroplasmataceae. Zusätzlich konnten umweltassoziierte Bakterienfamilien wie Comamonadaceae oder Pseudomonadaceae zu einem geringen Anteil detektiert werden.

Eine reduzierte, bakterielle Abundanz und Prävalenz im Zeckendarm verringert potentielle, nachteilige Wechselwirkungen zwischen pathogenen Bakterien und der Zecke und bietet damit einen evolutionären Vorteil für die Ansiedlung pathogener Bakterien im Zeckendarm (GUIZZO *et al.*, 2022). Demzufolge ist es ein großes Ziel der Zeckenforschung, die Mikrobiota des Zeckendarms zum Nachteil einer Pathogenbesiedelung oder -übertragung manipulieren zu können, um die Verbreitung von Zecken übertragenen Krankheiten zukünftig einzudämmen.

Dazu gibt es bereits Versuche mit artifiziellen, kapillären Zeckenfütterungssystemen (GUIZZO *et al.*, 2022; MILITZER *et al.*, 2022). Zecken werden gezielt mit Blut gefüttert, das Bakterien enthält, die wiederum die Vektorkompetenz für Pathogenübertragung negativ beeinflussen sollen (MACALUSO *et al.*, 2001; SONENSHINE *et al.*, 2002; GUIZZO *et al.*, 2022). Viele dieser Versuche scheiterten, da manche Bakterien, wie z. B. *Cand. Midichloria mitochondrii*, *Pantoea* spp. und *Micrococcus luteus*, die schon im Mitteldarm von *I. ricinus* nachgewiesen wurden, bisher nicht kultivierbar sind, sich artifiziell nicht ansiedeln oder schnell eliminiert und nicht mehr nachgewiesen werden können (GUIZZO *et al.*, 2022). Dazu kommt, dass das Wachstum und die Migration von *Bbsl* durch eine Dysbiose mittels antibiotischer Behandlung nicht beeinträchtigt zu werden scheint (NARASIMHAN *et al.*, 2022). Dazu wurde Gentamicin in einer Studie von NARASIMHAN *et al.* (2014) angewandt. Gentamicin ist ein Antibiotikum (AB) aus der Gruppe der Aminoglycoside und sollte den Großteil der umweltassoziierten Mikrobiota abtöten. Es wirkt aber nicht bakterizid gegen *Bbsl*. Unabhängig davon, ob die *I.-scapularis*-Zecken AB-behandeltes Blut aufnahmen oder aus der Negativkohorte stammten, saugten sie sich vollständig voll. Allerdings war die Anzahl der Bakterien in Zecken, die AB-behandeltes Blut aufnahmen, signifikant geringer. Die Kolonisierung von *Bbsl* im Darm und die Migration in die Speicheldrüsen scheint diese artifizielle Dysbiose nicht beeinträchtigen zu können (NARASIMHAN *et al.*, 2022). Es kam jedoch zu Mikrobiomveränderungen. In *I.-scapularis*-Zecken ist *Rickettsia buchneri* als einer der Hauptendosymbionten

beschrieben (KURTTI *et al.*, 2015; SAKAMOTO *et al.*, 2020). In Zecken, die AB-behandeltes Blut aufnahmen, konnten höhere Abundanzen von *R. buchneri*, geringere Abundanzen von Staphylokokken und kein Effekt für Pseudomonaden beobachtet werden (NARASIMHAN *et al.*, 2022).

Diese *in vitro* Ansätze mit dem Einsatz von Antibiotika sind jedoch stark umstritten. Meist werden Breitspektrum-AB eingesetzt, die keine direkten Zusammenhänge auf einzelne Bakterien zulassen, da sie viele Mikroorganismen gleichzeitig abtöten. Veränderungen von spezifischen OTUs und deren Auswirkung auf das Zeckenmikrobiom und auf die Vektorkompetenz sind bei Anwendung von Breitspektrum-AB nicht mehr nachvollziehbar (MATEOS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2021).

2.2 Das Mikrobiom der Speicheldrüsen

Bbss reproduziert sich im Mitteldarm und migriert schließlich über das *Hämocoel* (dt. Leibeshöhlenflüssigkeit der Zecken) in die Speicheldrüsen. Es stellt demnach neben dem Mitteldarm ein weiteres, zentrales Organ für die Übertragung von Pathogenen dar und steht im Fokus der Mikrobiomforschung an Zecken (HODOSI *et al.*, 2022). Es gibt allerdings auch Studien, die zeigen, dass sich *Bbss* bereits vor der Blutmahlzeit in den Speicheldrüsen befinden und somit auch in weniger als 24 Stunden übertragen werden kann (SERTOOUR *et al.*, 2018). Speicheldrüsen werden in diesem Zusammenhang auch als Reservoir-Organ in Erwägung gezogen (LEJAL *et al.*, 2019a). Neben *Bbss* beherbergen die Speicheldrüsen weitere Pathogene, wie *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Cand. Neoehrlichia mikurensis* oder *Coxiella* spp. (QIU *et al.*, 2014; LEJAL *et al.*, 2019a; ONDRUŠ *et al.*, 2020).

Borrelien-infizierte Zecken sezernieren signifikant mehr Speicheldrüsenproteine und weniger antimikrobielle Peptide im Vergleich zu nicht infizierten Zecken (KIM *et al.*, 2021). Außerdem ist die Genexpression für das Thioredoxin in *Bbss*-infizierten Zecken erhöht. Dieses Redox-Protein neutralisiert Sauerstoffperoxide, die für *Bbss* toxisch wären (KIM *et al.*, 2021). Da *Bbss* scheinbar in die Proteinzusammensetzung der Speicheldrüsen eingreift, liegt auch hier die Vermutung nahe, dass infizierte Zecken ein anderes Mikrobiom aufweisen können als nicht infizierte Zecken. Im Vergleich zur reduzierten Diversität des Mitteldarms weisen Speicheldrüsen ein diverseres Mikrobiom auf, wie aus Abbildung 10 ersichtlich wird und auch in der Literatur beschrieben wird (ZOLNIK *et al.*, 2016). Zusätzlich zu den genannten pathogenen Bakterien wurden

Endosymbionten wie *Spiroplasma* spp., *Cand. Midichloria mitochondrii* und *Rickettsiella* spp. im Speicheldrüsenmikrobiom dieser Arbeit detektiert (QIU *et al.*, 2014; GRANDI *et al.*, 2023; WIESINGER *et al.*, 2023). Außerdem besteht das Speicheldrüsenmikrobiom aus umweltassoziiertes Mikrobiota, wie *Acinetobacter* spp., *Corynebacterium* spp., *Cryobacterium* spp., *Chryseobacterium* spp., *Methylobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Sphingomonas* spp., *Staphylococcus* spp. und *Stenotrophomonas* spp. (QIU *et al.*, 2014; GRANDI *et al.*, 2023; WIESINGER *et al.*, 2023).

Um die komplexen, biologischen Prozesse in den Speicheldrüsen zu verstehen, reicht es nicht aus, eine statische Momentaufnahme des Mikrobioms zu analysieren. Die Zecken-Wirts-Interaktionen müssen mit zusätzlichen Methoden, wie Metatranscriptomics oder Metaproteomics beleuchtet werden (HERNANDEZ-JARGUIN *et al.*, 2018).

2.3 Einflüsse auf das Zeckenmikrobiom

Die Zusammensetzung, die Diversität und die Komplexität des Zeckenmikrobioms sind stark abhängig von Faktoren, wie dem Entwicklungsstadium der Zecke (Larve, Nymphe, adulte Zecke), dem Geschlecht, dem Alter, der geographische Lage des Sammelortes und dem Wirt (CARPI *et al.*, 2011; VAN TREUREN *et al.*, 2015; THAPA *et al.*, 2019; NARASIMHAN *et al.*, 2022).

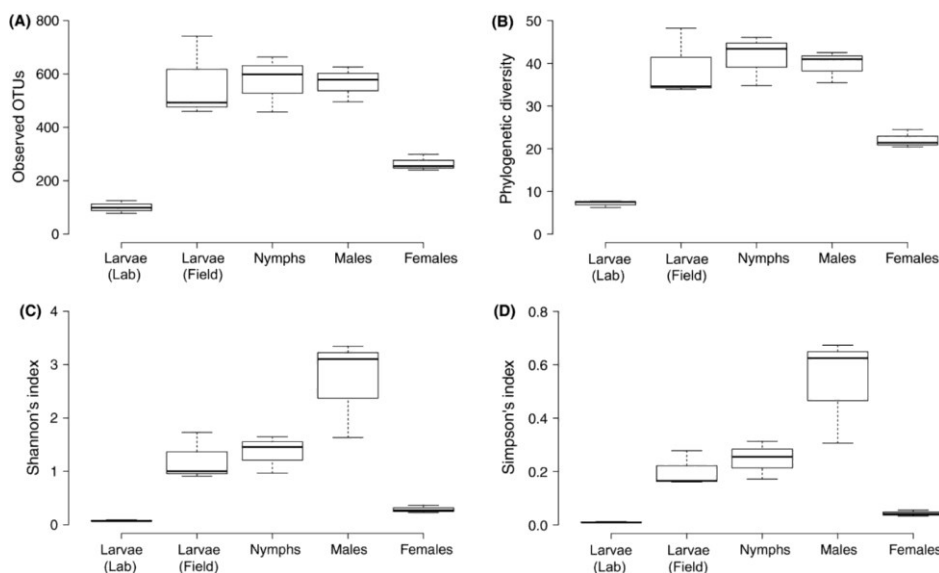


Abbildung 11: Parameter der α -Diversität für jedes Entwicklungsstadium

Die abgebildeten α -Diversitätsparameter zeigen die Anzahl der verzeichneten OTUs (A), die phylogenetische Diversität nach Faith (B), den Shannon-Index (C) und den Simpson-Index (D) der unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *Ixodes-scapularis*-Zecken. Nach ZOLNIK *et al.* (2016)

Nymphen besitzen z. B. ein Mikrobiom mit einer höheren bakteriellen Diversität als Larven (Abbildung 11). Im Gegensatz dazu weisen adulte, weibliche *Ixodes-scapularis*-Zecken die geringste α -Diversität auf. Dafür sind hohe relative Abundanzen des Endosymbionten *Rickettsia buchneri* charakteristisch für das Mikrobiom von adulten, weiblichen *Ixodes-scapularis*-Zecken (ZOLNIK *et al.*, 2016). Die Abnahme der bakteriellen Vielfalt von der Nymphe zur adulten, weiblichen Zecke wird mit Veränderungen im Hormonhaushalt und der Produktion der Eier erklärt (REES, 2004; ZOLNIK *et al.*, 2016). Die Ursprünge der bakteriellen Diversität stammen aus der transovariellen Weitergabe an die Nachkommen sowie zusätzlich aus der Umwelt (BRINKERHOFF *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020). Die Blutmahlzeit trägt zwar zu den Variationen der Zusammensetzung des Mikrobioms bei, mikrobielle Vielfalt wird darüber hinaus aber kaum gewonnen (ZOLNIK *et al.*, 2016; WU-CHUANG *et al.*, 2021).

Weitere Mikrobiomveränderungen treten auf, wenn Zecken länger ohne Nahrung auskommen mussten (AN *et al.*, 2022). Je länger *Rhipicephalus-sanguineus*-Zecken hungerten, desto mehr nahm z. B. die Abundanz ihres Hauptendosymbionten *Coxiella* spp. ab. Allerdings nahm die relative Abundanz der mikrobiellen Diversität zu, je länger die Zecken hungerten (AN *et al.*, 2022).

Wie bereits erwähnt, gilt es zu bedenken, dass Mikrobiomanalysen immer nur Momentaufnahmen sind und einen kleinen Ausschnitt des echten Mikrobioms wiedergeben. Für andere Studien wurden Zecken monatlich (LEJAL *et al.*, 2021) oder über drei Jahre gesammelt (LEJAL *et al.*, 2019b), um Informationen über die Veränderungen des Zeckenmikrobioms zu erhalten. Insgesamt liefern Langzeitstudien exaktere Daten zur Einzelbewertung und damit einen besseren Einblick in die Dynamiken des Zeckenmikrobioms und in die Interaktionen zwischen Zecke und Wirt.

2.4 Pathogene Bakterien im Zeckenmikrobiom

Bezüglich der potentiellen, pathogenen Bakterien konnten Borrelien, Anaplasmen, Rickettsien und *Cand. Neoehrlichia mikurensis* in den Zeckenproben dieser Arbeit nachgewiesen werden. Die folgende Ermittlung der Prävalenz beruht auf den gesamten, weiblichen Zeckenproben, die anhand der Mikrobiomdaten als positiv hinsichtlich ihrer *read*-Anzahl gewertet wurden (Tabelle 2).

In den gesamten, weiblichen Zeckenproben konnte eine *Bbsl*-Prävalenz von 5,7 % nachgewiesen werden. Andere Autoren ermittelten Prävalenzen zwischen 6,1 % und 38,1 % in Europa (SPRINGER *et al.*, 2020; ZUBRIKOVÁ *et al.*, 2020; GARCIA-VOZMEDIANO *et al.*, 2022). Die Prävalenz von *Anaplasma phagocytophilum* in *I. ricinus*-Zecken lag in dieser Arbeit bei 3,8 %. In der Literatur wird eine ähnliche Prävalenz zwischen 3,6 % und 11,6 % angegeben (SCHORN *et al.*, 2011; MAY & STRUBE, 2014). *Rickettsia helvetica* wurde in 19,8 % der *I. ricinus*-Zeckenproben gefunden. Bei Hunden wurde in Deutschland eine Seroprävalenz von 66,0 % gemeldet (WÄCHTER *et al.*, 2015), während die Prävalenz bei Zecken zwischen 12,0 % und 99,8 % lag (WÖLFEL *et al.*, 2006; TAPPE & STRUBE, 2013; KNOLL *et al.*, 2021). Darüber hinaus wurde *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in 11,3 % der *I. ricinus*-Zeckenproben detektiert, während andere Autoren eine Prävalenz von 24,0 % in Deutschland (SILAGHI *et al.*, 2012) oder 4,2 % in Österreich beschrieben (GLATZ *et al.*, 2014).

Tabelle 2: Prävalenzen der pathogenen Bakterien im Zeckenmikrobiom

	Prävalenz dieser Arbeit	Prävalenz anderer Autoren
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	3,8 %	3,6-11,6 %
<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	5,7 %	6,1-38,1 %
<i>Rickettsia helvetica</i>	19,8 %	12,0-99,8 %
<i>Cand. Neoehrlichia mikurensis</i>	11,3 %	4,2-24,0 %

3 Manipulation des Zeckenmikrobioms und Impfstoffentwicklung

Die Erforschung des Zeckenmikrobioms ist wie ein Werkzeug zum Verständnis der Zeckenbiologie und ihrer Vektorkompetenz (NARASIMHAN & FIKRIG, 2015; WU-CHUANG *et al.*, 2021). So versucht man, einen Angriffspunkt ausfindig zu machen, über den sich Zecken und durch Zecken übertragene Krankheiten kontrollieren lassen.

Zecken benötigen zwingend Blutmahlzeiten, um sich mit Nährstoffen für die weitere Entwicklung und Fortpflanzung zu versorgen. Dabei gelangen sie in Kontakt mit wirtsspezifischen Immunkomponenten, wie Antikörper oder Proteine des Komplement-Systems (HUSSAIN *et al.*, 2022). Die Immunkomponenten des

Wirtes werden in die Zeckenzellen transportiert und interagieren mit intrazellulären, zeckeneigenen Proteinen, was eine Kontrolle der Zecken oder der übertragbaren Pathogene über eine Immunisierung des Wirtes überhaupt erst ermöglicht (HUSSAIN *et al.*, 2022). Aktuell gibt es in Europa zwei zugelassene Impfstoffe gegen das FSME-Virus (BOGOVIC & STRLE, 2015). In den USA wurde erst im August 2021 ein FSME-Impfstoff zugelassen (PFIZER, 2021; PUGH *et al.*, 2022). Ein vielversprechender Impfstoff gegen Borrelien von Pfizer Inc. und Valneva SE befindet sich derzeit in der dritten klinischen Phase (PFIZER & VALNEVA, 2023). In Deutschland wurde 2019 bei etwa 306.000 Patienten eine Lyme-Borreliose diagnostiziert, was einer Diagnoseprävalenz zwischen 89 und 1.481 je 100.000 Versicherter pro Jahr mit enormen, regionalen Unterschieden entspricht (AKMATOV *et al.*, 2021). Daher ist eine Eindämmung dieser Infektionserkrankung und weiterer durch Zecken übertragener Erkrankungen erstrebenswert (VAN OOSTERWIJK & WIKEL, 2021).

Inzwischen gibt es ganzheitliche Versuche, einen Impfstoff gegen die Zecke über Anti-Mikrobiota Vakzine zu entwickeln. Mithilfe eines Wirt-Antikörpers soll auf die Vektormikrobiota abgezielt werden, um diese so zu manipulieren, dass Zecken nicht mehr in der Lage sind, Pathogene zu übertragen (MATEOS-HERNANDEZ *et al.*, 2020; HUSSAIN *et al.*, 2022; MAITRE *et al.*, 2022). Erste Erfolge dieser Impfstoffart konnten bei der Vogelmalaria verzeichnet werden – einer durch Mosquitos übertragenen Erkrankung. Die Immunisierung der Vögel gegen Enterobacteriaceae (z.B. *E. coli*) bedingt im Wirtsdarm des Vektors (*Culex pipiens* oder *Culex quinquefasciatus*) eine reduzierte Replikation von *Plasmodium relictum* (AŽELYTĖ *et al.*, 2022). Die *E.-coli*-spezifischen Wirtsantikörper sorgten dafür, dass signifikant weniger Oocysten und Sporozoitien im Mitteldarm und in den Speicheldrüsen der Mücke vorhanden waren (AŽELYTĖ *et al.*, 2022).

Um essentielle Bakterien innerhalb des Mikrobioms auffindig zu machen, werden häufig Netzwerkanalysen durchgeführt. Dafür werden Koexistenzen und Korrelationen statistisch berechnet, um sogenannte Schlüsselbakterien zu identifizieren. Für diese Charakterisierung werden Kriterien, wie hohe Eigenvektor-Zentralitätswerte, eine Omnipräsenz und die Kombination aus hoher relativer Häufigkeit und Eigenvektor-Zentralitätswerten herangezogen. Wie die Netzwerkanalyse in Abbildung 12 zeigt, scheinen Enterobacteriaceae auch im Mikrobiom von *I. ricinus* eine Schlüsselrolle zu übernehmen (MATEOS-HERNANDEZ *et al.*, 2020; MATEOS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2021). Daher wurde

ebenfalls ein *E.-coli*-Lebendimpfstoff für *Ixodes-ricinus*-Zecken im Mausmodell untersucht. Die Immunisierung mit *E. coli* reduzierte nicht nur die Abundanz der Enterobacteriaceae im Zeckendarm, sondern auch die bakterielle Diversität. Die Reduktion korrelierte mit hohen *E.-coli*-spezifischen IgG- und IgM-Antikörperspiegel und führte dazu, dass *E. coli* in den Netzwerkanalysen nicht mehr als Schlüsselbakterium auftrat (MATEOS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2021). Die daraus resultierende Mikrobiota wies eine geringere α -Diversität und eine Veränderung der ökologischen Profile auf. Die Entfernung von Schlüsselbakterien aus einer mikrobiellen Gemeinschaft könnte zu einer bakteriellen Dysbiose führen, die – ähnlich wie bei Wirbeltieren – eine beeinträchtigte Darmintegrität zur Folge haben könnte (HOOKS & O'MALLEY, 2017; BANERJEE *et al.*, 2018; GUTIÉRREZ & GARRIDO, 2019).

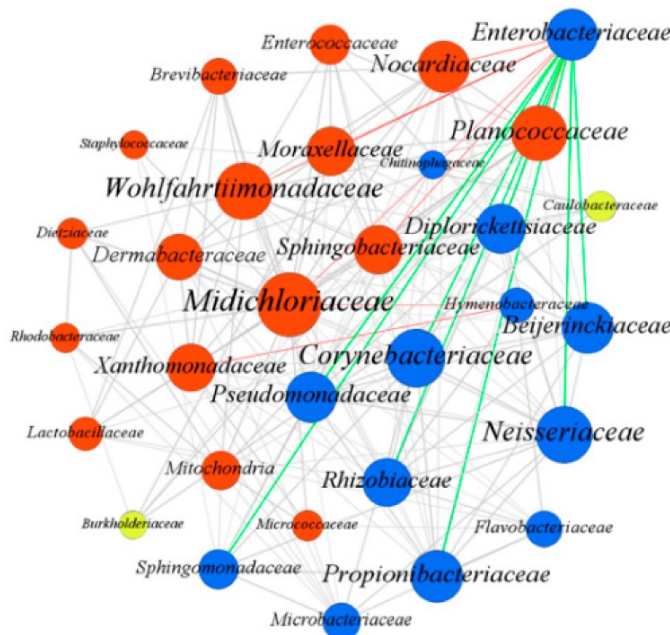


Abbildung 12: Netzwerkanalyse der Darmmikrobiota von *Ixodes-ricinus*-Nymphen

Die Netzwerkanalyse von *I.-ricinus*-Nymphen stellt Interaktionen zwischen Bakterienfamilien der Darmmikrobiota dar, die in hohen Abundanzen vorkommen. Die Knoten entsprechen den Taxa auf Familienebene und die Verbindungslinien zeigen signifikante ($p < 0,01$), positive oder negative Korrelationen ($\text{SparCC} > 0,7$ oder $< -0,7$). Die Farben der Knoten basieren auf der Modularitätsklassen-Metrik, d. h. dieselbe Farbe kennzeichnet Module mit koexistierenden Taxa. Die Größe der Knoten ist proportional zur Eigenvektor-Zentralität der einzelnen Taxa. Enterobacteriaceae sind oben rechts dargestellt. Die positiven (grün) und negativen (rot) Verbindungslinien sind hervorgehoben.

Nach MATEOS-HERNANDEZ *et al.* (2020).

Des Weiteren wurden in den Zecken, die eine Blutmahlzeit an geimpften Mäusen aufgenommen hatten, funktionale Veränderungen des Mikrobioms beobachtet.

Mithilfe einer PICRUSt2-Analyse (DOUGLAS *et al.*, 2020) konnte gezeigt werden, dass die Impfung die Expression der Gene reduziert, die für den Lysin-Abbau kodieren. Lysin gilt als eine essentielle Aminosäure – das Zeckengenom beherbergt also keine Gene, die für die Biosynthese des Lysins kodieren (CABEZAS-CRUZ *et al.*, 2017). Der Lysin-Abbau findet in Mitochondrien, im Zytosol oder in Peroxisomen statt (LEANDRO & HOUTEN, 2020). Eine negative Korrelation zwischen Enterobacteriaceae und Midichloriaceae kann in diesem Zusammenhang diskutiert werden (siehe rote Linie zwischen diesen bakteriellen Familien in Abbildung 12), da *Cand. Midichloria mitochondrii* überwiegend intramitochondrial vorgefunden wird (SASSERA *et al.*, 2006; COMANDATORE *et al.*, 2021). Erfreulicherweise zeigten die geimpften Mäuse weder Anzeichen von Schmerzempfinden noch Veränderungen ihres fäkalen Mikrobioms.

Es bleibt allerdings unklar, ob diese Veränderungen im Zeckenmikrobiom ausreichen, um die Vektorkompetenz der Zecke zu beeinflussen und ob Pathogene noch übertragen werden (MATEOS-HERNANDEZ *et al.*, 2020; MATEOS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2021). Außerdem stellt sich die Frage, ob das Abzielen auf ein einziges Bakterium ausreicht, um die gewünschten Veränderungen der Vektor-Pathogen-Interaktion hervorzurufen (MAITRE *et al.*, 2022). Hinzu kommen Limitationen für Anti-Mikrobiota-Impfstoffe für *Ixodes ricinus*-Zecken und ihren Hauptendosymbionten *Cand. Midichloria mitochondrii*, wie die bisherigen Kultivierungsschwierigkeiten. Darüber hinaus schließen sich Varianzen im Mikrobiom der Zecke durch genannte biotische und abiotische Faktoren und die Frage nach einem stabilen Kernmikrobiom bei Zecken an (VAN TREUREN *et al.*, 2015; THAPA *et al.*, 2019; GUIZZO *et al.*, 2022).

Der Zusammenhang zwischen Vektorkompetenz und Zeckenmikrobiom wird zum derzeitigen Stand der Wissenschaft immer noch nicht vollständig verstanden. In der Theorie wird allerdings ein funktionaler Zusammenhang zwischen Mitteldarmmikrobiom, dem JAK-STAT-Signalweg und der Kolonisierung der Pathogenen beschrieben (NARASIMHAN *et al.*, 2014; WU-CHUANG *et al.*, 2022). Ein dysbiotisches Darmmikrobiom der Zecke zeigt eine reduzierte Expression für die Biosynthese von Peritrophinen. Daraus resultiert eine verringerte Membranintegrität der peritrophischen Membran (PM), eine verringerte Anheftung an das Darmepithel und Kolonisierung der Spirochäten. Das lässt vermuten, dass eine *Bbsl*-Infektion in Zecken gewisse Bakterien im Mitteldarm benötigt, um die

PM-Integrität aufrecht zu erhalten und die Pathogenanheftung zu ermöglichen (NARASIMHAN *et al.*, 2014; WU-CHUANG *et al.*, 2022). Eine weitere Interaktion zwischen Borrelien und dem Mikrobiom besteht in der Expression von Zeckendarmproteinen, wie dem PIXR. Ein Versuch mit dem zielgerichteten Abschalten dieses *PIXR*-Gens (RNAi/Silencing) reduzierte die Kolonisierung von *Bbsl*, denn PIXR inhibiert die bakterielle Biofilmbildung. Es ist möglich, dass Veränderungen dieses Biofilms Auswirkungen auf die Adhärenz der Borrelien an das Darmepithel haben (NARASIMHAN *et al.*, 2017). Bei einer *A. phagocytophilum*-Infektion liegt umgekehrt eine reduzierte Expression von bestimmten Peritrophin-Genen vor. Eine gestörte PM-Integrität hilft *A. phagocytophilum*, sich erfolgreich ansiedeln zu können (ABRAHAM *et al.*, 2017). Die Studien zeigen, dass neben der Mikrobiota weitere Optionen existieren, um in essentielle Signalwege der Zecke einzugreifen. Proteine oder Enzyme, die für biosynthetische Vorgänge der Pathogene oder Endosymbionten eine wichtige Rolle spielen, könnten ebenfalls dazu dienen, z. B. einen rekombinanten Impfstoff zu erstellen (WU-CHUANG *et al.*, 2021; HUSSAIN *et al.*, 2022).

Schlussendlich konnte bisher noch kein erfolgsversprechender Durchbruch in der Zeckenforschung über *den einen* Impfstoffkandidaten erzielt werden. Hier sollte die Möglichkeit eines kombinierten Ansatzes für Anti-Mikrobiota Impfstoffe in Betracht gezogen werden, da die Übertragung der Pathogene ein komplexes System darstellt. Die Idee dabei ist, Kommensalen wie Enterobacteriaceae oder weitere Schlüsselbakterien der Netzwerkanalyse und Endosymbionten, wie *Cand. Midichloria mitochondrii* zu kombinieren, vorausgesetzt dieses Bakterium lässt sich demnächst kultivieren (MAITRE *et al.*, 2022). Man weiß zwar, dass Wirt-Antikörper im Darmlumen immer noch aktiv sind, das Darmepithel überschreiten und das *Hämocoel* erreichen können (ACKERMAN *et al.*, 1981; BEN-YAKIR *et al.*, 1987; WANG & NUTTALL, 1994; WILLADSEN, 1997). Es wurde jedoch noch nicht getestet, ob *Cand. M. mitochondrii* aufgrund der intramitochondrialen Lage durch Wirt-Antikörper erreicht werden kann (WU-CHUANG *et al.*, 2022). Es bedarf außerdem intensiver Forschung mit weiteren bioinformatischen Methoden, wie z. B. Netzwerkanalysen oder PICRUSt2-Analysen.

Die vorgestellte Studie leistet mit ihren Ergebnissen einen Beitrag zu einem präziseren Verständnis der Zeckenbiologie mit dem Fokus auf der Übertragung von Pathogenen. Dazu wurden nicht nur komplette Zeckenproben untersucht. Zusätzlich wurde die Mikrobiota von Zeckengewebeproben wie den Speicheldrüsen, dem Mitteldarm und den Überresten analysiert. Trotz der fehlenden Standardisierung in Mikrobiomstudien und vor allem während der Auswertung der Mikrobiomdaten können Vergleiche zu den genannten Publikationen gezogen werden und Übereinstimmungen bezüglich der Endosymbionten und der Diversität der Gewebeproben gefunden werden. Diese deskriptive Arbeit unterstreicht den Einsatz einer *mock community* und zeigt, dass sie nicht nur für die Überprüfung der Labortätigkeit hinsichtlich einer Kontamination, sondern vor allem für die bioinformatische Auswertung essentiell ist. Sie lässt den Rückschluss auf konkret eingesetzte Bakterien auf Genusebene zu. Die Auswertung stützt sich bei Bakterien von Interesse nicht mehr nur auf eine Abschätzung einer Vergleichsdatenbank. Außerdem legt diese Arbeit einen Grundbaustein für weitere Forschung am Zeckenmikrobiom. In weiteren, aufbauenden Schritten können saisonale Veränderungen mit einbezogen werden. Generell geben Langzeitstudien und mehrere Sammelzeitpunkte innerhalb eines Jahres genauere Tendenzen im Hinblick auf die Veränderungen innerhalb der Mikrobiota und der Entwicklung der übertragbaren Pathogene.

Die Ergebnisse dieser Studie heben die bereits in der Literatur diskutierten Endosymbionten (*Cand. Midichloria mitochondrii*, *Spiroplasma ixodetis* und *Rickettsiella* spp.) hervor. 99,5 % der weiblichen, kompletten *I. ricinus* Zecken beherbergten *Cand. Midichloria mitochondrii* in ihrer Mikrobiota. Durch Zecken übertragene Pathogene wie Borrelien, *Anaplasma phagocytophilum*, Rickettsien und *Cand. Neorhlichia mikurensis* konnten in unterschiedlichen Prävalenzen mithilfe der *16S-rRNA*-Genamplikon-Sequenzierung detektiert werden (siehe Tabelle 2). Die umweltassoziierte Mikrobiota (z.B. Beijerinckiaceae, *Methylobacterium* spp., *Sphingomonas* spp.) wurde ebenfalls anhand bestehender Literatur charakterisiert.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit ein neuer Ansatz beschrieben, wie Zecken seziiert und Zeckengewebe isoliert werden kann. Zecken-DNA wurde mit einer automatisierten DNA-Extraktionsmethode extrahiert. Automatisierte Systeme bieten sich vor allem für Proben mit geringer Biomasse an, da mit diesen Kontaminationen durch menschliche Fehler minimiert werden.

Eine zeckenspezifische *mock community* wurde zur Identifizierung von Pathogenen und Endosymbionten verwendet. Mit dieser Methode konnten sowohl die von anderen Autoren beschriebenen Endosymbionten der Zecken als auch die bekannten, zeckenübertragenen Infektionserreger identifiziert werden. Die Verwendung einer zeckenspezifischen *mock community* ermöglicht die Beobachtung von Zeckenpopulationen im Hinblick auf die Prävalenz von Pathogenen in einem bestimmten Gebiet, sowie die Entwicklung von Pathogenprävalenzen. Dieser Ansatz kann als Möglichkeit genutzt werden, die Gefahr von zeckenübertragenen Infektionen in bestimmten Wald- und Parkgebieten abzuschätzen und somit eine Gefahreinschätzung und gezielte Vorwarnung zu ermöglichen. Bezüglich der Pathogene konnte die Anwesenheit von Borrelien (5,7 %), *Anaplasma phagocytophilum* (3,8 %), Rickettsien (21,7 %) und *Cand. Neoehrlichia mikurensis* (11,3 %) in den kompletten Zeckenproben bestätigt werden.

Die Ergebnisse dieser Studie beschreiben die bakteriellen Gemeinschaften von kompletten *I. ricinus*-Zeckenproben, sowie die der präparierten Mitteldarm-, Speicheldrüsen- und Überrestproben. Sie lassen eine detailliertere Beschreibung der Mikrobiota von *I. ricinus*-Zecken zu, da die Mikrobiota in wesentlichen, an der Übertragung von Pathogenen beteiligten Geweben getrennt voneinander analysiert wurde. Außerdem konnten sie mit der Mikrobiota der kompletten Zeckenproben verglichen werden. Mitteldarmproben wiesen die geringste bakterielle Diversität auf im Vergleich zu den Speicheldrüsenproben und den Überrestproben. Sie enthielten fast ausschließlich bakterielle Familien, denen eine endosymbiontische Rolle zugeschrieben wird und wiesen nur geringe Abundanzen umweltassoziiierter Familien auf. Speicheldrüsenproben beinhalteten verhältnismäßig mehr umweltassoziierte Familien und eine Reihe von endosymbiontischen Familien.

Zuletzt zeigten Überrestproben hauptsächlich bakterielle Familien, die mit der Umwelt assoziiert werden.

In 99,5 % aller Zeckenproben konnte der Endosymbiont *Cand. Midichloria mitochondrii* nachgewiesen werden. Aufgrund seiner hohen Prävalenz und Abundanz gilt er als ein sehr vielversprechender Kandidat für die Entwicklung eines Anti-Mikrobiota Impfstoffs gegen Zecken. Allerdings lässt sich *Cand. M. mitochondrii* wegen seiner intramitochondrialen Lage bisher nicht kultivieren. *Rickettsiella* spp. wurden in 69,9 % und *Spiroplasma ixodetis* in 23,3 % aller Zeckenproben detektiert. Sie werden ebenfalls als mögliche Endosymbionten bei *I.-ricinus*-Zecken diskutiert.

Die detaillierte Erforschung des Zeckenmikrobioms dient dazu die physiologischen Prozesse in der Übertragung von Pathogenen besser und umfangreicher zu verstehen. Dies hat zum Ziel, in die Mikrobiota der Zecke eingreifen zu können und diese in Richtung einer Dysbiose verschieben zu können, um die Übertragung von Pathogenen zu reduzieren, wenn nicht sogar zu verhindern.

VI. SUMMARY

In conclusion, this work describes a new approach to dissect ticks and isolate tick tissue. Tick-DNA was extracted using an automated DNA extraction method. Automated systems are particularly useful for low biomass samples as contamination due to human error is minimized.

A tick-specific mock community was used to identify tick-specific pathogens and endosymbionts. Using this method, both tick endosymbionts described by other authors and known tick-borne pathogens were identified in tick sample. The use of a tick-specific mock community allows the monitoring of tick populations regarding the prevalence of pathogens in a given area as well as the development of pathogen prevalences. This approach could further be used as a possibility to assess the risk of tick-borne pathogens in forest and public park areas, allowing for hazard assessment and specific premonition. Regarding pathogens, the presence of *Borrelia* spp. (5.7%), *Anaplasma phagocytophilum* (3.8%), *Rickettsia* spp. (21.7%), and *Cand. Neoehrlichia mikurensis* (11.3%) was confirmed in the complete tick samples.

The results of this study describe the bacterial communities of complete *I. ricinus* tick samples, as well as those of dissected midgut, salivary gland, and residual samples. They allow a more detailed description of the microbiota of *I. ricinus* ticks, since the microbiota of essential tissues involved in pathogen transmission could be analyzed separately. In the following, they could be compared to the microbiota of complete *I. ricinus* ticks. Midgut samples had the lowest bacterial diversity compared to the salivary gland samples and the residual samples. They contained almost exclusively bacterial families with an endosymbiotic character and only low abundances of environmentally associated families. Salivary gland samples contained relatively more environmentally associated families and a variety of endosymbiotic families. Lastly, residual samples showed mainly families associated with the environment.

In 99.5% of all tick samples, the endosymbiont *Cand. Midichloria mitochondrii* was detected. Due to its high prevalence and abundance, it is considered a very promising candidate for the development of an anti-microbiota vaccine against ticks. However, *Cand. M. mitochondrii* could not be cultivated so far due to its

intramitochondrial location. Furthermore, *Rickettsiella* spp. was detected in 69.9% and *Spiroplasma ixodetis* in 23.3% of all tick samples. They are also discussed as possible endosymbionts in *I. ricinus* ticks.

The detailed study of the tick microbiome serves to a better and more comprehensive understanding of the physiological processes involved in the transmission of pathogens. The goal is to be able to intervene in the tick microbiota and shift it towards dysbiosis in order to reduce, if not prevent, pathogen transmission.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abellan-Schneyder I, Matchado MS, Reitmeier S, Sommer A, Sewald Z, Baumbach J, List M, Neuhaus K. Primer, Pipelines, Parameters: Issues in *16S rRNA* Gene Sequencing. *mSphere* 2021; 6

Abraham NM, Liu L, Jutras BL, Yadav AK, Narasimhan S, Gopalakrishnan V, Ansari JM, Jefferson KK, Cava F, Jacobs-Wagner C, Fikrig E. Pathogen-mediated manipulation of arthropod microbiota to promote infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2017; 114: 781-790.

Ackerman S, Clare FB, McGill TW, Sonenshine DE. Passage of host serum components, including antibody, across the digestive tract of *Dermacentor variabilis* (Say). *Journal of Parasitology* 1981; 67: 737-740.

Akmatov MK, Holstiege J, Dammertz L, Kohring C, Heuer J, Bätzing J. Bundesweite und kleinräumige Kennzahlen zur Morbidität von Lyme-Borreliose in Deutschland anhand vertragsärztlicher Abrechnungsdaten, 2010 bis 2019. Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland (Zi). 2021; Versorgungsatlas-Bericht Nr. 21/06.: 1-18.

Alasmari S, Wall R. Metabolic rate and resource depletion in the tick *Ixodes ricinus* in response to temperature. *Experimental and Applied Acarology* 2021; 83: 81-93.

Alkische AA, Peterson AT, Samy AM. Climate change influences on the potential geographic distribution of the disease vector tick *Ixodes ricinus*. *PLoS One* 2017; 12

Allen HK, Bayles DO, Looft T, Trachsel J, Bass BE, Alt DP, Bearson SM, Nicholson T, Casey TA. Pipeline for amplifying and analyzing amplicons of the V1-V3 region of the *16S rRNA* gene. *BMC Research Notes* 2016; 9: 380.

Almazán C, Šimo L, Fourniol L, Rakotobe S, Borneres J, Cote M, Peltier S, Mayé J, Versillé N, Richardson J, Bonnet SI. Multiple Antigenic Peptide-Based Vaccines Targeting *Ixodes ricinus* Neuropeptides Induce a Specific Antibody Response but Do Not Impact Tick Infestation. *Pathogens* 2020; 9

Álvarez J, Fernández Real JM, Guarner F, Gueimonde M, Rodríguez JM, Saenz de Pipaon M, Sanz Y. Gut microbes and health. *Gastroenterología y Hepatología* 2021; 44: 519-535.

Ameziane-El-Hassani R, Morand S, Boucher JL, Frapart YM, Apostolou D, Agnandji D, Gnidehou S, Ohayon R, Noël-Hudson MS, Francon J, Lalaoui K, Virion A, Dupuy C. Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca^{2+} -dependent H_2O_2 -generating activity. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 30046-30054.

Ammazzalorso AD, Zolnik CP, Daniels TJ, Kolokotronis SO. To beat or not to beat a tick: comparison of DNA extraction methods for ticks (*Ixodes scapularis*). *PeerJ* 2015; 3

An L, Bhowmick B, Liang D, Suo P, Liao C, Zhao J, Han Q. The microbiota changes of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* under starvation stress. *Frontiers in Physiology* 2022; 13

Anderson JF, Magnarelli LA. Biology of Ticks. *Infectious Disease Clinics of North America* 2008; 22: 195-215.

Antanaitis R, Juozaitienė V, Jonike V, Baumgartner W, Paulauskas A. Milk Lactose as a Biomarker of Subclinical Mastitis in Dairy Cows. *Animals* 2021; 11: 1736.

Anzaldi LL, Skaar EP. Overcoming the Heme Paradox: Heme Toxicity and Tolerance in Bacterial Pathogens. *Infection and Immunity* 2010; 78: 4977-4989.

Asbrink E, Brehmer-Andersson E, Hovmark A. *Acrodermatitis chronica atrophicans* - a spirochetosis. Clinical and histopathological picture based on 32 patients; course and relationship to *erythema chronicum migrans afzelius*. The American Journal of Dermatopathology 1986; 8: 209-219.

Ayllón N, Villar M, Galindo RC, Kocan KM, Šíma R, López JA, Vázquez J, Alberdi P, Cabezas-Cruz A, Kopáček P, De La Fuente J. Systems Biology of Tissue-Specific Response to *Anaplasma phagocytophilum* Reveals Differentiated Apoptosis in the Tick Vector *Ixodes scapularis*. PLOS Genetics 2015; 11

Azagi T, Klement E, Perlman G, Lustig Y, Mumcuoglu KY, Apanaskevich DA, Gottlieb Y. *Francisella*-Like Endosymbionts and *Rickettsia* Species in Local and Imported *Hyalomma* Ticks. Applied and Environmental Microbiology 2017; 83

Aželytė J, Wu-Chuang A, Žiegytė R, Platonova E, Mateos-Hernandez L, Maye J, Obregon D, Palinauskas V, Cabezas-Cruz A. Anti-Microbiota Vaccine Reduces Avian Malaria Infection Within Mosquito Vectors. Frontiers in Immunology 2022; 13

Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. Journal of Microbiological Methods 2003; 55: 541-555.

Bakken JS, Dumler JS. Human Granulocytic Anaplasmosis. Infectious Disease Clinics of North America 2015; 29: 341-355.

Balashov YS. Bloodsucking ticks (Ixodoidea)—vectors of diseases of man and animals. In: Bloodsucking Ticks (Ixodoidea)—Vectors of Diseases of Man and Animals: BioOne 1972: 167.

Banerjee S, Schlaeppli K, van der Heijden MGA. Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. Nature Reviews Microbiology 2018; 16: 567-576.

Baranton G, Assous M, Postic D. Three bacterial species associated with Lyme borreliosis. Clinical and diagnostic implications. Bulletin de L'academie Nationale de Medecine 1992; 176: 1075-1086.

Bastian FO. The Case for Involvement of *Spiroplasma* in the Pathogenesis of Transmissible Spongiform Encephalopathies. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology 2014; 73: 104-114.

Beaufays J, Adam B, Menten-Dedoyart C, Fievez L, Grosjean A, Decrem Y, Prévôt P-P, Santini S, Brasseur R, Brossard M, Vanhaeverbeek M, Bureau F, Heinen E, Lins L, Vanhamme L, Godfroid E. Ir-LBP, an *Ixodes ricinus* Tick Salivary LTB4-Binding Lipocalin, Interferes with Host Neutrophil Function. PLoS One 2008; 3: 3987.

Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition 2013; 98: 236-238.

Ben-Yakir D, Fox CJ, Homer JT, Barker RW. Quantification of host immunoglobulin in the hemolymph of ticks. Journal of Parasitology 1987; 73: 669-671.

Berg G, Köberl M, Rybakova D, Müller H, Grosch R, Smalla K. Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. FEMS Microbiology Ecology 2017; 93

Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès M-CC, Charles T, Chen X, Cocolin L, Eversole K, Corral GH, Kazou M, Kinkel L, Lange L, Lima N, Loy A, Macklin JA, Maguin E, Mauchline T, McClure R, Mitter B, Ryan M, Sarand I, Smidt H, Schelkle B, Roume H, Kiran GS, Selvin J, Souza R, De SC, Van Overbeek L, Singh BK, Wagner M, Walsh A, Sessitsch A, Schloter M. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. Microbiome 2020; 8

Bharti R, Grimm DG. Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. Briefings in Bioinformatics 2021; 22: 178-193.

Biggs HM, Behravesh CB, Bradley KK, Dahlgren FS, Drexler NA, Dumler JS, Folk SM, Kato CY, Lash RR, Levin ML, Massung RF, Nadelman RB, Nicholson WL, Paddock CD, Pritt BS, Traeger MS. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever and Other Spotted Fever Group Rickettsioses, Ehrlichioses, and Anaplasmosis - United States. *MMWR Recommendations and Report* 2016; 65: 1-44.

Binetruy F, Dupraz M, Buysse M, Duron O. Surface sterilization methods impact measures of internal microbial diversity in ticks. *Parasites & Vectors* 2019; 12

Binnington KC. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *International Journal for Parasitology* 1978; 8: 97-115.

Blaser M. Antibiotic overuse: Stop the killing of beneficial bacteria. *Nature* 2011; 476: 393-394.

Bloomfield SF, Stanwell-Smith R, Crevel RW, Pickup J. Too clean, or not too clean: the hygiene hypothesis and home hygiene. *Clinical and Experimental Allergy* 2006; 36: 402-425.

Bogovic P, Strle F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World Journal of Clinical Cases* 2015; 3: 430-441.

Bohacsova M, Mediannikov O, Kazimirova M, Raoult D, Sekeyova Z. *Arsenophonus nasoniae* and *Rickettsiae* Infection of *Ixodes ricinus* Due to Parasitic Wasp *Ixodiphagus hookeri*. *PLoS One* 2016; 11

Bonnet SI, Binetruy F, Hernández-Jarguín AM, Duron O. The Tick Microbiome: Why Non-pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and Pathogen Transmission. *Frontiers in Cellular and Infectious Microbiology* 2017; 7: 236.

Bonnet SI, Pollet T. Update on the intricate tango between tick microbiomes and tick-borne pathogens. *Parasite Immunology* 2021; 43.

Borawski K, Dunaj J, Pancewicz S, Król M, Czupryna P, Moniuszko-Malinowska A. Tick-borne rickettsioses in Europe – a review. *Przegląd Epidemiologiczny* 2019; 73: 523-530.

Boulanger N, Boyer P, Talagrand-Reboul E, Hansmann Y. Ticks and tick-borne diseases. *Médecine et Maladies Infectieuses* 2019; 49: 87-97.

Bowman AS, Sauer JR. Tick salivary glands: function, physiology and future. *Parasitology* 2004; 129: 67-81.

Bowman AS, Nuttall PA (2008) *Ticks: biology, disease and control*. Cambridge University Press

Bray JR, Curtis JT. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 1957; 27: 326-349.

Brenner AE, Muñoz-Leal S, Sachan M, Labruna MB, Raghavan R. *Coxiella burnetii* and Related Tick Endosymbionts Evolved from Pathogenic Ancestors. *Genome Biology and Evolution* 2021; 13

Briers Y, Staubli T, Schmid MC, Wagner M, Schuppler M, Loessner MJ. Intracellular vesicles as reproduction elements in cell wall-deficient L-form bacteria. *PLoS One* 2012; 7

Brinkerhoff RJ, Clark C, Ocasio K, Gauthier DT, Hynes WL. Factors affecting the microbiome of *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum*. *PLoS One* 2020; 15

Brossard M. Rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* L.: Effects of mepyramine on acquired resistance. *Experientia* 1982; 38: 702-704.

Budachetri K, Kumar D, Crispell G, Beck C, Dasch G, Karim S. The tick endosymbiont *Candidatus* Midichloria mitochondrii and selenoproteins are essential for the growth of *Rickettsia parkeri* in the Gulf Coast tick vector. *Microbiome* 2018; 6: 141.

Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme disease - a tick-borne spirochetosis? *Science* 1982; 216: 1317-1319.

Cabezas-Cruz A, Espinosa PJ, Obregon DA, Alberdi P, de La Fuente. *Ixodes scapularis* tick cells control *Anaplasma phagocytophilum* infection by increasing the synthesis of phosphoenolpyruvate from tyrosine. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2017; 7: 375.

Caimano MJ, Kenedy MR, Kairu T, Desrosiers DC, Harman M, Dunham-Ems S, R. D, Akins DR, Pal U, Radolf JD, Camilli A. The Hybrid Histidine Kinase Hk1 Is Part of a Two-Component System That Is Essential for Survival of *Borrelia burgdorferi* in Feeding *Ixodes scapularis* Ticks. *Infection and Immunity* 2011; 79: 3117-3130.

Caimano MJ, Groshong AM, Belperron A, Mao J, Hawley KL, Luthra A, Graham DE, Earnhart CG, Marconi RT, Bockenstedt LK, Blevins JS, Radolf JD. The RpoS Gatekeeper in *Borrelia burgdorferi*: An Invariant Regulatory Scheme That Promotes Spirochete Persistence in Reservoir Hosts and Niche Diversity. *Frontiers in Microbiology* 2019; 10

Carpi G, Cagnacci F, Wittekindt NE, Zhao F, Qi J, Tomsho LP, Drautz DI, Rizzoli A, Schuster SC. Metagenomic profile of the bacterial communities associated with *Ixodes ricinus* ticks. *PLoS One* 2011; 6

Carroll JF. Responses of Three Species of Adult Ticks (Acari: Ixodidae) to Chemicals in the Coats of Principal and Minor Hosts. *Journal of Medical Entomology* 1999; 36: 238-242.

Carroll JF. Interdigital Gland Substances of White-Tailed Deer and the Response of Host-Seeking Ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 2001; 38: 114-117.

Cavicchioli R, Ripple WJ, Timmis KN, Azam F, Bakken LR, Baylis M, Behrenfeld MJ, Boetius A, Boyd PW, Classen AT, Crowther TW, Danovaro R, Foreman CM, Huisman J, Hutchins DA, Jansson JK, Karl DM, Koskella B, Mark Welch DB, Martiny JBH, Moran MA, Orphan VJ, Reay DS, Remais JV, Rich VI, Singh BK, Stein LY, Stewart FJ, Sullivan MB, Van Oppen MJH, Weaver SC, Webb EA, Webster NS. Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nature Reviews Microbiology* 2019; 17: 569-586.

Celina SS, Cerný J. *Coxiella burnetii* in ticks, livestock, pets and wildlife: A mini-review. *Frontiers in Veterinary Science* 2022; 9

Chateau A, Schneewind O, Missiakas D. Extraction and Purification of Wall-Bound Polymers of Gram-Positive Bacteria. *Methods in Molecular Biology* 2019; 1954: 47-57.

Chen J, Bittinger K, Charlson ES, Hoffmann C, Lewis J, Wu GD, Collman RG, Bushman FD, Li H. Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics* 2012; 28: 2106-2113.

Choi K-S, Park JT, Dumler JS. *Anaplasma phagocytophilum* Delay of Neutrophil Apoptosis through the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Pathway. *Infection and Immunity* 2005; 73: 8209-8218.

Chou S, Daugherty MD, Peterson SB, Biboy J, Yang Y, Jutras BL, Fritz-Laylin LK, Ferrin MA, Harding BN, Jacobs-Wagner C, Yang XF, Vollmer W, Malik HS, Mougous JD. Transferred interbacterial antagonism genes augment eukaryotic innate immune function. *Nature* 2015; 518: 98-101.

Cisak E, Wójcik-Fatla A, Zając V, Sawczyn A, Sroka J, Dutkiewicz J. *Spiroplasma* – an emerging arthropod-borne pathogen? *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2015; 22: 589-593.

Clark HF. Suckling mouse cataract agent. *Journal of Infectious Diseases* 1964; 114: 476-487.

Clymer BC, Howell D, Hair JA. Animal hosts of economically important ticks (Acarina) in east-central Oklahoma. *Annals of the Entomological Society of America* 1970; 63: 612-613.

Colovas J, Bintarti AF, Mechan Llontop ME, Grady KL, Shade A. Do-it-Yourself Mock Community Standard for Multi-Step Assessment of Microbiome Protocols. *Current Protocols* 2022; 2

Comandatore F, Radaelli G, Montante S, Sacchi L, Clementi E, Epis S, Cafiso A, Serra V, Pajoro M, Di Carlo D, Floriano AM, Stavru F, Bandi C, Sassera D. Modeling the Life Cycle of the Intramitochondrial Bacterium "*Candidatus* *Midichloria mitochondrii*" Using Electron Microscopy Data. *mBio* 2021; 12

Cook M. Lyme borreliosis: a review of data on transmission time after tick attachment. *International Journal of General Medicine* 2014; 1.

Corona A, Schwartz I. *Borrelia burgdorferi*: Carbon Metabolism and the Tick-Mammal Enzootic Cycle. *Microbiology Spectrum* 2015; 3

Crooks E, Randolph SE. Walking by *Ixodes ricinus* ticks: intrinsic and extrinsic factors determine the attraction of moisture or host odour. *Journal of Experimental Biology* 2006; 209: 2138-2142.

Daniel M. Influence of the microclimate on the vertical distribution of the tick *Ixodes ricinus* (L) in Central Europe. *Acarologia* 1993; 34: 105-113.

Dantas-Torres F, Lia RP, Capelli G, Otranto D. Efficiency of flagging and dragging for tick collection. *Experimental and Applied Acarology* 2013; 61: 119-127.

Dautel H, Dippel C, Kämmer D, Werkhausen A, Kahl O. Winter activity of *Ixodes ricinus* in a Berlin forest. *International Journal of Medical Microbiology* 2008; 298: 50-54.

Davis RE, Worley JF, Whitcomb RF, Ishijima T, Steere RL. Helical Filaments Produced by a *Mycoplasma*-Like Organism Associated with Corn Stunt Disease. *Science* 1972; 176: 521-523.

De la Fuente J, Almazán C, Naranjo V, Blouin EF, Kocan KM. Synergistic effect of silencing the expression of tick protective antigens 4D8 and Rs86 in *Rhipicephalus sanguineus* by RNA interference. *Parasitology Research* 2006; 99: 108-113.

De Silva AM, Fikrig E. Growth and Migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* Ticks during Blood Feeding. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1995; 53: 397-404.

Djihinto OY, Medjigbodo AA, Gangbadja ARA, Saizonou HM, Lagnika HO, Nanmede D, Djossou L, Bohounton R, Sovegnon PM, Fanou MJ, Agonhossou R, Akoton R, Mousse W, Djogbénou LS. Malaria-Transmitting Vectors Microbiota: Overview and Interactions With *Anopheles* Mosquito Biology. *Frontiers in Microbiology* 2022; 13

Domingue GJ, Sr., Woody HB. Bacterial persistence and expression of disease. *Clinical Microbiology Reviews* 1997; 10: 320-344.

Donkó A, Péterfi Z, Sum A, Leto T, Geiszt M. Dual oxidases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2005; 360: 2301-2308.

Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld JR, Yurgel SN, Brown JR, Taylor CM, Huttenhower C, Langille MGI. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology* 2020; 38: 685-688.

Dupré J, O'Malley MA. Varieties of living things: life at the intersection of lineage and metabolism. 2009;

Duron O, Cremaschi J, McCoy KD. The High Diversity and Global Distribution of the Intracellular Bacterium *Rickettsiella* in the Polar Seabird Tick *Ixodes uriae*. *Microbial Ecology* 2016; 71: 761-770.

Edgar RC. Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics* 2018; 34: 2371-2375.

Eisenhofer R, Minich JJ, Marotz C, Cooper A, Knight R, Weyrich LS. Contamination in Low Microbial Biomass Microbiome Studies: Issues and Recommendations. *Trends in Microbiology* 2019; 27: 105-117.

Epis S, Mandrioli M, Genchi M, Montagna M, Sacchi L, Pistone D, Sassera D. Localization of the bacterial symbiont *Candidatus* Midichloria mitochondrii within the hard tick *Ixodes ricinus* by whole-mount FISH staining. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2013; 4: 39-45.

Errington J, Mickiewicz K, Kawai Y, Wu LJ. L-form bacteria, chronic diseases and the origins of life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2016; 371

Estrada-Peña A. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Revue scientifique et technique* 2015; 34: 53-65.

Estrada-Peña A, De La Fuente J, Ostfeld RS, Cabezas-Cruz A. Interactions between tick and transmitted pathogens evolved to minimise competition through nested and coherent networks. *Scientific Reports* 2015; 5

Estrada-Peña A, Cabezas-Cruz A, Obregón D. Resistance of Tick Gut Microbiome to Anti-Tick Vaccines, Pathogen Infection and Antimicrobial Peptides. *Pathogens* 2020; 9: 309.

Farassat N, Reich M, Serr A, Küchlin S, Erwemi M, Auw-Hädrich C, Krastel H, Lagrèze WA. *Spiroplasma* species as a rare cause of congenital cataract and uveitis: a case series. *BMC Ophthalmology* 2021; 21: 434.

Felsenfeld O (1971) *Borrelia*: strains, vectors, human and animal borreliosis

Fernández-Ruiz N, Pinecki-Socias S, Estrada-Peña A, Wu-Chuang A, Maitre A, Obregón D, Cabezas-Cruz A, de Blas I, Nijhof AM. Decontamination protocols affect the internal microbiota of ticks. *Parasites & Vectors* 2023; 16: 189.

Fingerle V, Munderloh UG, Liegl G, Wilske B. Coexistence of ehrlichiae of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. *Medical Microbiology and Immunology* 1999; 188: 145-149.

Fogaça AC, da Silva PI, Jr., Miranda MT, Bianchi AG, Miranda A, Ribolla PE, Daffre S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 25330-25334.

Foley J, Nieto N. *Anaplasma phagocytophilum* subverts tick salivary gland proteins. *Trends in Parasitology* 2007; 23: 3-5.

Foster J, Ganatra M, Kamal I, Ware J, Makarova K, Ivanova N, Bhattacharyya A, Kapatral V, Kumar S, Posfai J, Vincze T, Ingram J, Moran L, Lapidus A, Omelchenko M, Kyrpides N, Ghedin E, Wang S, Goltsman E, Joukov V, Ostrovskaya O, Tsukerman K, Mazur M, Comb D, Koonin E, Slatko B. The *Wolbachia* Genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont Evolution within a Human Pathogenic Nematode. *PLoS Biology* 2005; 3: 121.

Fournier P-E, Grunnenberger F, Jaulhac B, Gastinger G, Raoult D. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. *Emerging Infectious Diseases* 2000; 6: 389-392.

Fournier P-E, Allombert C, Supputamongkol Y, Caruso G, Brouqui P, Raoult D. Aneruptive Fever Associated with Antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42: 816-818.

Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb J-F, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, Van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Weidman J, Utterback T, Watthey L, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Garland S, Fujii C, Cotton MD, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith HO, Venter JC. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 1997; 390: 580-586.

Fuchs H, Wallich R, Simon MM, Kramer MD. The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 1994; 91: 12594-12598.

Fukuda K, Ogawa M, Taniguchi H, Saito M. Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the *16S Ribosomal RNA* Gene. *Journal of UOEH* 2016; 38: 223-232.

Garcia-Vozmediano A, Krawczyk AI, Sprong H, Rossi L, Ramassa E, Tomassone L. Ticks climb the mountains: *Ixodid* tick infestation and infection by tick-borne pathogens in the Western Alps. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2020; 11

Garcia-Vozmediano A, Tomassone L, Fonville M, Bertolotti L, Heylen D, Fabri ND, Medlock JM, Nijhof AM, Hansford KM, Sprong H, Krawczyk AI. The Genetic Diversity of *Rickettsiella* Symbionts in *Ixodes ricinus* Throughout Europe. *Microbial Ecology* 2022; 84: 613-626.

Garcia R. Carbon Dioxide as an Attractant for Certain Ticks (Acarina: Argasidae and Ixodidae). *Annals of the Entomological Society of America* 1962; 55: 605-606.

Gest H. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. *Notes and Records of the Royal Society of London* 2004; 58: 187-201.

Gherardini F, Boylan J, Lawrence K, Skare J. Metabolism and physiology of *Borrelia*. *Borrelia: molecular biology, host interaction and pathogenesis* 2010: 103-138.

Ghera RL, Werren JH, Weisburg W, Cote R, Woese CR, Mandelco L, Brenner DJ. *Arsenophonus nasoniae* gen. nov., sp. nov., the Causative Agent of the Son-Killer Trait in the Parasitic Wasp *Nasonia vitripennis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1991; 41: 563-565.

Gilot B, Laforge ML, Pichot J, Raoult D. Relationships between the *Rhipicephalus sanguineus* complex ecology and Mediterranean spotted fever epidemiology in France. *European Journal of Epidemiology* 1990; 6: 357-362.

Ginsberg HS, Ewing CP. Comparison of flagging, walking, trapping, and collecting from hosts as sampling methods for northern deer ticks, *Ixodes dammini*, and lone-star ticks, *Amblyomma americanum* (Acari:Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology* 1989; 7: 313-322.

Glatz M, Müllegger RR, Maurer F, Fingerle V, Achermann Y, Wilske B, Bloemberg GV. Detection of *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis, *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies and *Anaplasma phagocytophilum* in a tick population from Austria. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2014; 5: 139-144.

Goodman RL, Arndt KA, Steigbigel NH. *Borrelia* in Boston. *Jama* 1969; 210: 722-723.

Gordon JR, McLaughlin BG, Nitiuthai S. Tularaemia transmitted by ticks (*Dermacentor andersoni*) in Saskatchewan. Canadian Journal of Comparative Medicine 1983; 47: 408-411.

Gottlieb Y, Lalar I, Klasson L. Distinctive Genome Reduction Rates Revealed by Genomic Analyses of Two *Coxiella*-Like Endosymbionts in Ticks. Genome Biology and Evolution 2015; 7: 1779-1796.

Grandi G, Chiappa G, Ullman K, Lindgren PE, Olivieri E, Sasser D, Östlund E, Omazic A, Perissinotto D, Söderlund R. Characterization of the bacterial microbiome of Swedish ticks through *16S rRNA* amplicon sequencing of whole ticks and of individual tick organs. Parasites & Vectors 2023; 16: 39.

Granick JL, Reneer DV, Carlyon JA, Borjesson DL. *Anaplasma phagocytophilum* infects cells of the megakaryocytic lineage through sialylated ligands but fails to alter platelet production. Journal of Medical Microbiology 2008; 57: 416-423.

Gray JS. A carbon dioxide trap for prolonged sampling of *Ixodes ricinus* L. populations. Experimental and Applied Acarology 1985; 1: 35-44.

Greay TL, Gofton AW, Papparini A, Ryan UM, Oskam CL, Irwin PJ. Recent insights into the tick microbiome gained through next-generation sequencing. Parasites & Vectors 2018; 11

Grobe N, Cherif A, Wang X, Dong Z, Kotanko P. Sample pooling: burden or solution? Clinical Microbiology and Infection 2021; 27: 1212-1220.

Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada Peña A, Horak IG, Shao R, Barker SC. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. 2010;

Guizzo MG, Parizi LF, Nunes RD, Schama R, Albano RM, Tirloni L, Oldiges DP, Vieira RP, Oliveira WHC, Leite MS, Gonzales SA, Farber M, Martins O, Vaz IDS, Jr., Oliveira PL. A *Coxiella* mutualist symbiont is essential to the development of *Rhipicephalus microplus*. *Scientific Reports* 2017; 7

Guizzo MG, Neupane S, Kucera M, Perner J, Frantova H, da Silva Vaz I, de Oliveira PL, Kopacek P, Zurek L. Poor Unstable Midgut Microbiome of Hard Ticks Contrasts With Abundant and Stable Monospecific Microbiome in Ovaries. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2020; 10: 211.

Guizzo MG, Dolezelikova K, Neupane S, Frantova H, Hrbatova A, Pafco B, Fiorotti J, Kopacek P, Zurek L. Characterization and manipulation of the bacterial community in the midgut of *Ixodes ricinus*. *Parasites & Vectors* 2022; 15

Gulia-Nuss M, Nuss AB, Meyer JM, Sonenshine DE, Roe RM, Waterhouse RM, Sattelle DB, De La Fuente J, Ribeiro JM, Megy K, Thimmapuram J, Miller JR, Walenz BP, Koren S, Hostetler JB, Thiagarajan M, Joardar VS, Hannick LI, Bidwell S, Hammond MP, Young S, Zeng Q, Abrudan JL, Almeida FC, Ayllón N, Bhide K, Bissinger BW, Bonzon-Kulichenko E, Buckingham SD, Caffrey DR, Caimano MJ, Croset V, Driscoll T, Gilbert D, Gillespie JJ, Giraldo-Calderón GI, Grabowski JM, Jiang D, Khalil SMS, Kim D, Kocan KM, Koči J, Kuhn RJ, Kurtti TJ, Lees K, Lang EG, Kennedy RC, Kwon H, Perera R, Qi Y, Radolf JD, Sakamoto JM, Sánchez-Gracia A, Severo MS, Silverman N, Šimo L, Tojo M, Tornador C, Van Zee JP, Vázquez J, Vieira FG, Villar M, Wespiser AR, Yang Y, Zhu J, Arensburger P, Pietrantonio PV, Barker SC, Shao R, Zdobnov EM, Hauser F, Grimmelikhuijzen CJP, Park Y, Rozas J, Benton R, Pedra JHF, Nelson DR, Unger MF, Tubio JMC, Tu Z, Robertson HM, Shumway M, Sutton G, Wortman JR, Lawson D, Wikel SK, Nene VM, Fraser CM, Collins FH, Birren B, Nelson KE, Caler E, Hill CA. Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nature Communications* 2016; 7

Guo X, Booth CJ, Paley MA, Wang X, Deponte K, Fikrig E, Narasimhan S, Montgomery RR. Inhibition of Neutrophil Function by Two Tick Salivary Proteins. *Infection and Immunity* 2009; 77: 2320-2329.

Gusmão DS, Santos AV, Marini DC, Bacci Jr M, Berbert-Molina MA, Lemos FJA. Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. *Acta Tropica* 2010; 115: 275-281.

Gutiérrez N, Garrido D. Species Deletions from Microbiome Consortia Reveal Key Metabolic Interactions between Gut Microbes. *mSystems* 2019; 4

Haddad V, Jr., Haddad MR, Santos M, Cardoso JLC. Skin manifestations of tick bites in humans. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 2018; 93: 251-255.

Haine ER. Symbiont-mediated protection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2008; 275: 353-361.

Hajdušek O, Síma R, Ayllón N, Jalovecká M, Perner J, de la Fuente J, Kopáček P. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2013; 3: 26.

Harris RA, Kaufman WR. Hormonal control of salivary gland degeneration in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. *Journal of Insect Physiology* 1981; 27: 241-248.

Harrison AG (2016) Lyme Disease: The Immunological Response to *Borrelia burgdorferi*. 77

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

He J, Chu Y, Li J, Meng Q, Liu Y, Jin J, Wang Y, Wang J, Huang B, Shi L, Shi X, Tian J, Zhufeng Y, Feng R, Xiao W, Gan Y, Guo J, Shao C, Su Y, Hu F, Sun X, Yu J, Kang Y, Li Z. Intestinal butyrate-metabolizing species contribute to autoantibody production and bone erosion in rheumatoid arthritis. *Science Advances* 2022; 8

He M, Ouyang Z, Troxell B, Xu H, Moh A, Piesman J, Norgard MV, Gomelsky M, Yang XF. Cyclic di-GMP is essential for the survival of the lyme disease spirochete in ticks. *PLoS Pathogens* 2011; 7

Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual Review of Entomology* 2009; 54: 285-302.

Hegedus DD, Toprak U, Erlandson M. Peritrophic matrix formation. *Journal of Insect Physiology* 2019; 117

Heimstädt O. Das Fluoreszenzmikroskop. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Mikroskopie* 1911; 28: 330-337.

Heinze DM, Carmical JR, Aronson JF, Thangamani S. Early Immunologic Events at the Tick-Host Interface. *PLoS One* 2012; 7

Hernandez-Jarguin A, Diaz-Sanchez S, Villar M, de la Fuente J. Integrated metatranscriptomics and metaproteomics for the characterization of bacterial microbiota in unfed *Ixodes ricinus*. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2018; 9: 1241-1251.

Herron MJ, Ericson ME, Kurtti TJ, Munderloh UG. The interactions of *Anaplasma phagocytophilum*, endothelial cells, and human neutrophils. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005; 1063: 374-382.

Hertig M, Wolbach SB. Studies on *Rickettsia*-Like Micro-Organisms in Insects. The Journal of Medical Research 1924; 44: 329-375.

Hickl O, Heintz-Buschart A, Trautwein-Schult A, Hercog R, Bork P, Wilmes P, Becher D. Sample Preservation and Storage Significantly Impact Taxonomic and Functional Profiles in Metaproteomics Studies of the Human Gut Microbiome. Microorganisms 2019; 7: 367.

Highlander S. Mock Community Analysis: Springer New York 2014: 1-7.

HMP C. A framework for human microbiome research. Nature 2012; 486: 215-221.

Ho HE, Bunyavanich S. Role of the Microbiome in Food Allergy. Current Allergy and Asthma Reports 2018; 18: 27.

Hodosi R, Kazimirova M, Soltys K. What do we know about the microbiome of *I. ricinus*? Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 2022; 12

Hoerauf A, Volkmann L, Nissen-Paehle K, Schmetz C, Autenrieth I, Buttner DW, Fleischer B. Targeting of *Wolbachia* endobacteria in *Litomosoides sigmodontis*: comparison of tetracyclines with chloramphenicol, macrolides and ciprofloxacin. Tropical Medicine and International Health 2000; 5: 275-279.

Hoerauf A, Specht S, Marfo-Debrekeyi Y, Büttner M, Debrah AY, Mand S, Batsa L, Brattig N, Konadu P, Bandi C, Fimmers R, Adjei O, Büttner DW. Efficacy of 5-week doxycycline treatment on adult *Onchocerca volvulus*. Parasitology Research 2009; 104: 437-447.

Hoffmann A, Fingerle V, Noll M. Analysis of Tick Surface Decontamination Methods. Microorganisms 2020; 8

Hollander M, Wolfe DA, Chicken E (2013) Nonparametric statistical methods. John Wiley & Sons

Hooks KB, O'Malley MA. Dysbiosis and Its Discontents. *mBio* 2017; 8

Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C, Zhu D, Koya JB, Wei L, Li J, Chen ZS. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Target Therapy* 2022; 7: 135.

Hübner A, Yang X, Nolen DM, Popova TG, Cabello FC, Norgard MV. Expression of *Borrelia burgdorferi* OspC and DbpA is controlled by a RpoN-RpoS regulatory pathway. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 2001; 98: 12724-12729.

Hunfeld K-P. *Borrelien*: Springer Berlin Heidelberg 2020: 487-498.

Hunter DJ, Torkelson JL, Bodnar J, Mortazavi B, Laurent T, Deason J, Thephavongsa K, Zhong J. The *Rickettsia* Endosymbiont of *Ixodes pacificus* Contains All the Genes of De Novo Folate Biosynthesis. *PLoS One* 2015; 10

Hurry G, Maluenda E, Sarr A, Belli A, Hamilton PT, Duron O, Plantard O, Voordouw MJ. Infection with *Borrelia afzelii* and manipulation of the egg surface microbiota have no effect on the fitness of immature *Ixodes ricinus* ticks. *Scientific Reports* 2021; 11

Hussain S, Perveen N, Hussain A, Song B, Aziz MU, Zeb J, Li J, George D, Cabezas-Cruz A, Sparagano O. The Symbiotic Continuum Within Ticks: Opportunities for Disease Control. *Frontiers in Microbiology* 2022; 13

Illumina Inc. Sequencing: Introduction to Sequencing by Synthesis (SBS). 2021: <https://www.youtube.com/watch?v=oIJJa6h2bFM&t=1s>. 13.01.2023.

Institute of Medicine (2006) *Ending the War Metaphor*. National Academies Press, Washington, DC. 91

Institute of Medicine, Board on Global Health, Forum on Microbial Threats, Mack A, Choffnes ER, Relman DA, Hamburg MA (2009) Microbial Evolution and Co-Adaptation : A Tribute to the Life and Scientific Legacies of Joshua Lederberg: Workshop Summary. National Academies Press, Washington, D.C., UNITED STATES

Iretton K. Molecular mechanisms of cell–cell spread of intracellular bacterial pathogens. *Open Biology* 2013; 3

Jenkins SV, Vang KB, Gies A, Griffin RJ, Jun S-R, Nookaew I, Dings RPM. Sample storage conditions induce post-collection biases in microbiome profiles. *BMC Microbiology* 2018; 18

Justice SS, Hunstad DA, Cegelski L, Hultgren SJ. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nature Reviews Microbiology* 2008; 6: 162-168.

Kahl O, Knülle W. Water vapour uptake from subsaturated atmospheres by engorged immature ixodid ticks. *Experimental and Applied Acarology* 1988; 4: 73-83.

Kariu T, Smith A, Yang X, Pal U. A chitin deacetylase-like protein is a predominant constituent of tick peritrophic membrane that influences the persistence of Lyme disease pathogens within the vector. *PLoS One* 2013; 8

Karstens L, Asquith M, Davin S, Fair D, Gregory WT, Wolfe AJ, Braun J, McWeeney S. Controlling for Contaminants in Low-Biomass *16S rRNA* Gene Sequencing Experiments. *mSystems* 2019; 4

Karvonen K, Nykky J, Marjomäki V, Gilbert L. Distinctive Evasion Mechanisms to Allow Persistence of *Borrelia burgdorferi* in Different Human Cell Lines. *Frontiers in Microbiology* 2021; 12

Kazimirova M, Stibraniova I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2013; 3

Keiz K, Ulrich S, Wenderlein J, Keferloher P, Wiesinger A, Neuhaus K, Lagkouvardos I, Wedekind H, Straubinger RK. The Development of the Bacterial Community of Brown Trout (*Salmo trutta*) during Ontogeny. *Microorganisms* 2023; 11

Kemp DH, Stone BF, Binnington KC. Tick Attachment and Feeding: Role of the Mouthparts, Feeding Apparatus, Salivary Gland Secretions and the Host Response. In: *Physiology of Ticks*. Obenchain FD, Galun R, eds.: Pergamon 1982: 119-168.

Kendall HW (2000) *A Distant Light: Scientists and Public Policy*. 198-201

Kenedy MR, Lenhart TR, Akins DR. The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2012; 66: 1-19.

Kim TK, Tirloni L, Bencosme-Cuevas E, Kim TH, Diedrich JK, Yates JR, 3rd, Mulenga A. *Borrelia burgdorferi* infection modifies protein content in saliva of *Ixodes scapularis* nymphs. *BMC Genomics* 2021; 22: 152.

Kitsou C, Foor SD, Dutta S, Bista S, Pal U. Tick gut barriers impacting tick-microbe interactions and pathogen persistence. *Molecular Microbiology* 2021; 116: 1241-1248.

Knight R, Vrbanac A, Taylor BC, Aksenov A, Callewaert C, Debelius J, Gonzalez A, Kosciolk T, McCall L-I, McDonald D, Melnik AV, Morton JT, Navas J, Quinn RA, Sanders JG, Swafford AD, Thompson LR, Tripathi A, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhu Q, Caporaso JG, Dorrestein PC. Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology* 2018; 16: 410-422.

Knoll S, Springer A, Hauck D, Schunack B, Pachnicke S, Strube C. Regional, seasonal, biennial and landscape-associated distribution of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. infections in Ixodes ticks in northern Germany and implications for risk assessment at larger spatial scales. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2021; 12

Konopka A. What is microbial community ecology? *The ISME Journal* 2009; 3: 1223-1230.

Kopáček P, Hajdusek O, Buresová V, Daffre S. Tick innate immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2010; 708: 137-162.

Kostick JL, Szkotnicki LT, Rogers EA, Bocci P, Raffaelli N, Marconi RT. The diguanylate cyclase, Rrp1, regulates critical steps in the enzootic cycle of the Lyme disease spirochetes. *Molecular Microbiology* 2011; 81: 219-231.

Krawczyk AI, Röttjers L, Fonville M, Takumi K, Takken W, Faust K, Sprong H. Quantitative microbial population study reveals geographical differences in bacterial symbionts of *Ixodes ricinus*. *Microbiome* 2022; 10

Kubes M, Kocáková P, Slovák M, Sláviková M, Fuchsberger N, Nuttall PA. Heterogeneity in the effect of different ixodid tick species on human natural killer cell activity. *Parasite Immunology* 2002; 24: 23-28.

Kubinski M, Beicht J, Gerlach T, Volz A, Sutter G, Rimmelzwaan GF. Tick-Borne Encephalitis Virus: A Quest for Better Vaccines against a Virus on the Rise. *Vaccines* 2020; 8

Kullberg BJ, Vrijmoeth HD, van de Schoor F, Hovius JW. Lyme borreliosis: diagnosis and management. *The BMJ* 2020; 369

Kurokawa C, Lynn GE, Pedra JHF, Pal U, Narasimhan S, Fikrig E. Interactions between *Borrelia burgdorferi* and ticks. *Nature Reviews Microbiology* 2020; 18: 587-600.

Kurtti TJ, Felsheim RF, Burkhardt NY, Oliver JD, Heu CC, Munderloh UG. *Rickettsia buchneri* sp. nov., a rickettsial endosymbiont of the blacklegged tick *Ixodes scapularis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2015; 65: 965-970.

Kwan JY, Griggs R, Chicana B, Miller C, Swei A. Vertical vs. horizontal transmission of the microbiome in a key disease vector, *Ixodes pacificus*. *Molecular Ecology* 2017; 26: 6578-6589.

Lagkouvardos I, Joseph D, Kapfhammer M, Giritli S, Horn M, Haller D, Clavel T. IMNGS: A comprehensive open resource of processed 16S rRNA microbial profiles for ecology and diversity studies. *Scientific Reports* 2016; 6

Lagkouvardos I, Fischer S, Kumar N, Clavel T. Rhea: a transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on *16S rRNA* gene amplicons. *PeerJ* 2017; 5

Lam S, Bai X, Shkoporov AN, Park H, Wu X, Lan P, Zuo T. Roles of the gut virome and mycobiome in faecal microbiota transplantation. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* 2022; 7: 472-484.

Landesman WJ, Mulder K, Fredericks LP, Allan BF. Cross-kingdom analysis of nymphal-stage *Ixodes scapularis* microbial communities in relation to *Borrelia burgdorferi* infection and load. *FEMS Microbiology Ecology* 2019; 95

Landmann F. The *Wolbachia* Endosymbionts. *Microbiology Spectrum* 2019; 7

Larsen OFA, Claassen E. The mechanistic link between health and gut microbiota diversity. *Scientific Reports* 2018; 8

Lau WL, Tran T, Rhee CM, Kalantar-Zadeh K, Vaziri ND. Diabetes and the Gut Microbiome. *Seminars in Nephrology* 2021; 41: 104-113.

Leandro J, Houten SM. The lysine degradation pathway: Subcellular compartmentalization and enzyme deficiencies. *Molecular Genetics and Metabolism* 2020; 131: 14-22.

Lederberg J. Infectious History. *Science* 2000; 288: 287-293.

Lederberg J, McCray AT. 'Ome Sweet 'Omics - A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist* 2001; 15: 8.

Lejal E, Moutailler S, Simo L, Vayssier-Taussat M, Pollet T. Tick-borne pathogen detection in midgut and salivary glands of adult *Ixodes ricinus*. *Parasites & Vectors* 2019a; 12: 152.

Lejal E, Marsot M, Chalvet-Monfray K, Cosson J-F, Moutailler S, Vayssier-Taussat M, Pollet T. A three-years assessment of *Ixodes ricinus*-borne pathogens in a French peri-urban forest. *Parasites & Vectors* 2019b; 12

Lejal E, Chiquet J, Aubert J, Robin S, Estrada-Peña A, Rue O, Midoux C, Mariadassou M, Bailly X, Cougoul A, Gasqui P, Cosson JF, Chalvet-Monfray K, Vayssier-Taussat M, Pollet T. Temporal patterns in *Ixodes ricinus* microbial communities: an insight into tick-borne microbe interactions. *Microbiome* 2021; 9

Lentz CS, Halls V, Hannam JS, Niebel B, Strübing U, Mayer G, Hoerauf A, Famulok M, Pfarr KM. A Selective Inhibitor of Heme Biosynthesis in Endosymbiotic Bacteria Elicits Antifilarial Activity In Vitro. *Chemistry & Biology* 2013; 20: 177-187.

Lindgren E, Gustafson R. Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change. *The Lancet* 2001; 358: 16-18.

Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *The Lancet* 2008; 371: 1861-1871.

Littman MP, Straubinger RK, Sykes JE. Borreliosis. In: *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 5 edn. Sykes JE, ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders 2023: 824-852.

Liu L, Narasimhan S, Dai J, Zhang L, Cheng G, Fikrig E. *Ixodes scapularis* salivary gland protein P11 facilitates migration of *Anaplasma phagocytophilum* from the tick gut to salivary glands. *EMBO Reports* 2011; 12: 1196-1203.

Lo N, Beninati T, Sasser D, Bouman EAP, Santagati S, Gern L, Sambri V, Masuzawa T, Gray JS, Jaenson TGT, Bouattour A, Kenny MJ, Guner ES, Kharitonov IG, Bitam I, Bandi C. Widespread distribution and high prevalence of an alpha-proteobacterial symbiont in the tick *Ixodes ricinus*. *Environmental Microbiology* 2006; 8: 1280-1287.

Lopez J, Hovius JW, Bergström S. Pathogenesis of Relapsing Fever. *Current Issues in Molecular Biology* 2021; 42: 519-550.

Macaluso KR, Sonenshine DE, Ceraul SM, Azad AF. Infection and transovarial transmission of rickettsiae in *Dermacentor variabilis* ticks acquired by artificial feeding. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2001; 1: 45-53.

Maitre A, Wu-Chuang A, Aželytė J, Palinauskas V, Mateos-Hernández L, Obregon D, Hodžić A, Valiente Moro C, Estrada-Peña A, Paoli J-C, Falchi A, Cabezas-Cruz A. Vector microbiota manipulation by host antibodies: the forgotten strategy to develop transmission-blocking vaccines. *Parasites & Vectors* 2022; 15: 4.

Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 2015; 3

Margos G, Gofton A, Wibberg D, Dangel A, Marosevic D, Loh SM, Oskam C, Fingerle V. The genus *Borrelia* reloaded. PLoS One 2018; 13

Mateos-Hernandez L, Obregon D, Maye J, Borneres J, Versille N, de la Fuente J, Estrada-Pena A, Hodzic A, Simo L, Cabezas-Cruz A. Anti-Tick Microbiota Vaccine Impacts *Ixodes ricinus* Performance during Feeding. Vaccines 2020; 8

Mateos-Hernández L, Obregón D, Wu-Chuang A, Maye J, Bornères J, Versillé N, de la Fuente J, Díaz-Sánchez S, Bermúdez-Humarán LG, Torres-Maravilla E, Estrada-Peña A, Hodžić A, Šimo L, Cabezas-Cruz A. Anti-Microbiota Vaccines Modulate the Tick Microbiome in a Taxon-Specific Manner. Frontiers in Immunology 2021; 12

Mather TN, Piesman J, Spielman A. Absence of spirochaetes (*Borrelia burgdorferi*) and piroplasms (*Babesia microti*) in deer ticks (*Ixodes dammini*) parasitized by chalcid wasps (*Hunterellus hookeri*). Medical and Veterinary Entomology 1987; 1: 3-8.

May K, Strube C. Prevalence of Rickettsiales (*Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp.) in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the city of Hamburg, Germany. Parasitology Research 2014; 113: 2169-2175.

Medlock JM, Hansford KM, Bormane A, Derdakova M, Estrada-Peña A, George J-C, Golovljova I, Jaenson TGT, Jensen J-K, Jensen PM, Kazimirova M, Oteo JA, Papa A, Pfister K, Plantard O, Randolph SE, Rizzoli A, Santos-Silva MM, Sprong H, Vial L, Hendrickx G, Zeller H, Van Bortel W. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. Parasites & Vectors 2013; 6: 1.

Mejlon HA, Jaenson TGT. Questing behaviour of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). Experimental and Applied Acarology 1997; 21: 747-754.

Meriläinen L, Herranen A, Schwarzbach A, Gilbert L. Morphological and biochemical features of *Borrelia burgdorferi* pleomorphic forms. *Microbiology* 2015; 161: 516-527.

Meriläinen L, Brander H, Herranen A, Schwarzbach A, Gilbert L. Pleomorphic forms of *Borrelia burgdorferi* induce distinct immune responses. *Microbes and Infection* 2016; 18: 484-495.

Militzer N, Bartel A, Clausen P-H, Hoffmann-Köhler P, Nijhof AM. Artificial Feeding of All Consecutive Life Stages of *Ixodes ricinus*. *Vaccines* 2021; 9: 385.

Militzer N, Pinecki Socias S, Nijhof AM. Changes in the *Ixodes ricinus* microbiome associated with artificial tick feeding. *Frontiers in Microbiology* 2022; 13

Miller CL, Karna SL, Seshu J. *Borrelia* host adaptation Regulator (BadR) regulates *rpoS* to modulate host adaptation and virulence factors in *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology* 2013; 88: 105-124.

Minchin PR. An evaluation of the relative robustness of techniques for ecological ordination. *Vegetatio* 1987; 69: 89-107.

Moran NA. Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *The Proceedings of the National Academy of Science* 2007; 104 Suppl 1: 8627-8633.

Mullegger RR. Dermatological manifestations of Lyme borreliosis. *European Journal of Dermatology* 2004; 14: 296-309.

Munderloh UG, Jauron SD, Fingerle V, Leitritz L, Hayes SF, Hautman JM, Nelson CM, Huberty BW, Kurtti TJ, Ahlstrand GG, Greig B, Mellencamp MA, Goodman JL. Invasion and Intracellular Development of the Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent in Tick Cell Culture. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37: 2518-2524.

Murtagh F, Legendre P. Ward's Hierarchical Agglomerative Clustering Method: Which Algorithms Implement Ward's Criterion? *Journal of Classification* 2014; 31: 274-295.

Nadal-Jimenez P, Griffin JS, Davies L, Frost CL, Marcello M, Hurst GDD. Genetic manipulation allows in vivo tracking of the life cycle of the son-killer symbiont, *Arsenophonus nasoniae*, and reveals patterns of host invasion, tropism and pathology. *Environmental Microbiology* 2019; 21: 3172-3182.

Najm N-A, Silaghi C, Bell-Sakyi L, Pfister K, Passos LMF. Detection of bacteria related to *Candidatus* Midichloria mitochondrii in tick cell lines. *Parasitology Research* 2012; 110: 437-442.

Nakajima Y, Ogihara K, Taylor D, Yamakawa M. Antibacterial hemoglobin fragments from the midgut of the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Journal of Medical Entomology* 2003; 40: 78-81.

Narasimhan S, Rajeevan N, Liu L, Yang, Heisig J, Pan J, Eppler-Epstein R, DePonte K, Fish D, Fikrig E. Gut Microbiota of the Tick Vector *Ixodes scapularis* Modulate Colonization of the Lyme Disease Spirochete. *Cell Host & Microbe* 2014; 15: 58-71.

Narasimhan S, Fikrig E. Tick microbiome: the force within. *Trends in Parasitology* 2015; 31: 315-323.

Narasimhan S, Schuijt TJ, Abraham NM, Rajeevan N, Coumou J, Graham M, Robson A, Wu M-J, Daffre S, Hovius JW, Fikrig E. Modulation of the tick gut milieu by a secreted tick protein favors *Borrelia burgdorferi* colonization. *Nature Communications* 2017; 8

Narasimhan S, Rajeevan N, Graham M, Wu MJ, DePonte K, Marion S, Masson O, O'Neal AJ, Pedra JHF, Sonenshine DE, Fikrig E. Tick transmission of *Borrelia burgdorferi* to the murine host is not influenced by environmentally acquired midgut microbiota. *Microbiome* 2022; 10: 173.

Nava S, Guglielmone AA, Mangold AJ. An overview of systematics and evolution of ticks. *Frontiers in Bioscience-Landmark* 2009; 14: 2857-2877.

Needham GR, Teel PD. Off-host physiological ecology of ixodid ticks. *Annual Review of Entomology* 1991; 36: 659-681.

Neelakanta G, Sultana H, Fish D, Anderson JF, Fikrig E. *Anaplasma phagocytophilum* induces *Ixodes scapularis* ticks to express an antifreeze glycoprotein gene that enhances their survival in the cold. *Journal of Clinical Investigation* 2010; 120: 3179-3190.

Nguyen Trong TP, Wang J, Majzoub-Altweck M, Fell S, Straubinger RK. Recovering host cell-free *Anaplasma phagocytophilum* from HL-60 cells by using rock tumbler grit in comparison to the syringe lysis method. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2019; 10: 280-285.

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

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

Ogata S, Mohamed WMA, Kusakisako K, Thu MJ, Qiu Y, Moustafa MAM, Matsuno K, Katakura K, Nonaka N, Nakao R. *Spiroplasma* Infection among Ixodid Ticks Exhibits Species Dependence and Suggests a Vertical Pattern of Transmission. *Microorganisms* 2021; 9

Oliveira JH, Gonçalves RL, Lara FA, Dias FA, Gandara AC, Menna-Barreto RF, Edwards MC, Laurindo FR, Silva-Neto MA, Sorgine MH, Oliveira PL. Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. *PLoS Pathogens* 2011; 7

Olivieri E, Epis S, Castelli M, Varotto Boccazzi I, Romeo C, Desirò A, Bazzocchi C, Bandi C, Sasseria D. Tissue tropism and metabolic pathways of *Midichloria mitochondrii* suggest tissue-specific functions in the symbiosis with *Ixodes ricinus*. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2019; 10: 1070-1077.

Ondruš J, Kulich P, Sychra O, Široký P. Putative morphology of *Neoehrlichia mikurensis* in salivary glands of *Ixodes ricinus*. *Scientific Reports* 2020; 10

Oren A, Garrity GM. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2021; 71

Oschmann P, Dorndorf W, Hornig C, Schäfer C, Wellensiek HJ, Pflughaupt KW. Stages and syndromes of neuroborreliosis. *Journal of Neurology* 1998; 245: 262-272.

Ostfeld RS, Brunner JL. Climate change and *Ixodes* tick-borne diseases of humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2015; 370

Oteo JA, Estrada-Peña A, Ortega-Pérez C, Martínez de Artola V. Mediterranean spotted fever: a preliminary tick field study. *European Journal of Epidemiology* 1996; 12: 475-478.

Ouyang Z, Deka RK, Norgard MV. BosR (BB0647) controls the RpoN-RpoS regulatory pathway and virulence expression in *Borrelia burgdorferi* by a novel DNA-binding mechanism. *PLoS Pathogens* 2011; 7

Pachner AR, Steere AC. The triad of neurologic manifestations of Lyme disease: meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis. *Neurology* 1985; 35: 47-53.

Paine SH, Kemp DH, Allen JR. In vitro feeding of *Dermacentor andersoni* (Stiles): effects of histamine and other mediators. *Parasitology* 1983; 86 (Pt 3): 419-428.

Pal U, De Silva AM, Montgomery RR, Fish D, Anguita J, Anderson JF, Lobet Y, Fikrig E. Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *Journal of Clinical Investigation* 2000; 106: 561-569.

Pal U, Li X, Wang T, Montgomery RR, Ramamoorthi N, Desilva AM, Bao F, Yang X, Pypaert M, Pradhan D, Kantor FS, Telford S, Anderson JF, Fikrig E. TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell* 2004; 119: 457-468.

Palmer WJ, Jiggins FM. Comparative Genomics Reveals the Origins and Diversity of Arthropod Immune Systems. *Molecular Biology and Evolution* 2015; 32: 2111-2129.

Patangia DV, Anthony Ryan C, Dempsey E, Paul Ross R, Stanton C. Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *MicrobiologyOpen* 2022; 11

Peirce JM, Alviña K. The role of inflammation and the gut microbiome in depression and anxiety. *Journal of Neuroscience Research* 2019; 97: 1223-1241.

Pel J, Leung A, Choi WWY, Despotovic M, Ung WL, Shibahara G, Gelinas L, Marziali A. Rapid and highly-specific generation of targeted DNA sequencing libraries enabled by linking capture probes with universal primers. *PLoS One* 2018; 13

Perner J, Provazník J, Schrenková J, Urbanová V, Ribeiro JM, Kopáček P. RNA-seq analyses of the midgut from blood- and serum-fed *Ixodes ricinus* ticks. *Scientific Reports* 2016; 6

Perret J-L, Guerin PM, Diehl PA, Vlimant M, Gern L. Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. *Journal of Experimental Biology* 2003; 206: 1809-1815.

Perveen N, Muzaffar SB, Vijayan R, Al-Deeb MA. Assessing Temporal Changes in Microbial Communities in *Hyalomma dromedarii* Collected From Camels in the UAE Using High-Throughput Sequencing. *Frontiers in Veterinary Science* 2022; 9

Pfizer I. TicoVac - Package Insert. Food and Drug Administration (FDA) 2021: <https://www.fda.gov/media/151502/download>.

Pfizer I, Valneva. Pfizer and Valneva Issue Update on Phase 3 Clinical Trial Evaluating Lyme Disease Vaccine Candidate VLA15. [pfizer.com](https://www.pfizer.com/news/announcements/pfizer-and-valneva-issue-update-phase-3-clinical-trial-evaluating-lyme-disease): 2023: <https://www.pfizer.com/news/announcements/pfizer-and-valneva-issue-update-phase-3-clinical-trial-evaluating-lyme-disease>. 17.02.2023.

Piesman J, Gern L. Lyme borreliosis in Europe and North America. *Parasitology* 2004; 129 Suppl: 191-220.

Pilla R, Suchodolski JS. The Gut Microbiome of Dogs and Cats, and the Influence of Diet. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2021; 51: 605-621.

Plantard O, Bouju-Albert A, Malard M-A, Hermouet A, Capron G, Verheyden H. Detection of *Wolbachia* in the Tick *Ixodes ricinus* is Due to the Presence of the Hymenoptera Endoparasitoid *Ixodiphagus hookeri*. *PLoS One* 2012; 7

Popov VL, Han VC, Chen SM, Dumler JS, Feng HM, Andreadis TG, Tesh RB, Walker DH. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *Journal of Medical Microbiology* 1998; 47: 235-251.

Portillo A, Palomar AM, de Toro M, Santibanez S, Santibanez P, Oteo JA. Exploring the bacteriome in anthropophilic ticks: To investigate the vectors for diagnosis. *PLoS One* 2019; 14

Price DRG, Bartley K, Blake DP, Karp-Tatham E, Nunn F, Burgess STG, Nisbet AJ. A *Rickettsiella* Endosymbiont Is a Potential Source of Essential B-Vitamins for the Poultry Red Mite, *Dermanyssus gallinae*. *Frontiers in Microbiology* 2021; 12

Psifidi A, Dovas CI, Bramis G, Lazou T, Russel CL, Arsenos G, Banos G. Comparison of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples. *PLoS One* 2015; 10

Pugh SJ, Moisi JC, Kundi M, Santonja I, Erber W, Angulo FJ, Jodar L. Effectiveness of two doses of tick-borne encephalitis (TBE) vaccine. *Journal of Travel Medicine* 2022; 29

Qian XB, Chen T, Xu YP, Chen L, Sun FX, Lu MP, Liu YX. A guide to human microbiome research: study design, sample collection, and bioinformatics analysis. *Chinese Medical Journal* 2020; 133: 1844-1855.

Qiu Y, Nakao R, Ohnuma A, Kawamori F, Sugimoto C. Microbial population analysis of the salivary glands of ticks; a possible strategy for the surveillance of bacterial pathogens. *PLoS One* 2014; 9

Ramamoorthy R, Scholl-Meecker D. *Borrelia burgdorferi* proteins whose expression is similarly affected by culture temperature and pH. *Infection and Immunity* 2001; 69: 2739-2742.

Randerson JP, Smith NGC, Hurst LD. The evolutionary dynamics of male-killers and their hosts. *Heredity* 2000; 84: 152-160.

Ranjit DK, Young KD. The Rcs stress response and accessory envelope proteins are required for de novo generation of cell shape in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 2013; 195: 2452-2462.

Rees HH. Hormonal control of tick development and reproduction. *Parasitology* 2004; 129 Suppl: 127-143.

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

Requena-García F, Cabrero-Sañudo F, Olmeda-García S, González J, Valcárcel F. Influence of environmental temperature and humidity on questing ticks in central Spain. *Experimental and Applied Acarology* 2017; 71: 277-290.

Richter D, Matuschka FR, Spielman A, Mahadevan L. How ticks get under your skin: insertion mechanics of the feeding apparatus of *Ixodes ricinus* ticks. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2013; 280

Rikihisa Y, Zhi N, Wormser GP, Wen B, Horowitz HW, Hechemy KE. Ultrastructural and Antigenic Characterization of a Granulocytic Ehrlichiosis Agent Directly Isolated and Stably Cultivated from a Patient in New York State. *The Journal of Infectious Diseases* 1997; 175: 210-213.

Rizzoli A, Silaghi C, Obiegala A, Rudolf I, Hubalek Z, Foldvari G, Plantard O, Vayssier-Taussat M, Bonnet S, Spitalska E, Kazimirova M. *Ixodes ricinus* and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. *Frontiers in Public Health* 2014; 2: 251.

Robert Koch-Institut. Antworten auf häufig gestellte Fragen zu Borreliose. RKI 2014: <https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Borreliose/Borreliose.html>. 14.05.2023.

Rogers Y-H, Zhang C. Genomic technologies in medicine and health: past, present, and future. In: *Medical and health genomics*: Elsevier 2016: 15-28.

Rosenwald LC, Sitvarin MI, White JA. Endosymbiotic *Rickettsiella* causes cytoplasmic incompatibility in a spider host. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2020; 287

Ross BD, Hayes B, Radey MC, Lee X, Josek T, Bjork J, Neitzel D, Paskewitz S, Chou S, Mougous JD. *Ixodes scapularis* does not harbor a stable midgut microbiome. *The ISME Journal* 2018; 12: 2596-2607.

Sajid A, Matias J, Arora G, Kurokawa C, Deponete K, Tang X, Lynn G, Wu M-J, Pal U, Strank NO, Pardi N, Narasimhan S, Weissman D, Fikrig E. mRNA vaccination induces tick resistance and prevents transmission of the Lyme disease agent. *Science Translational Medicine* 2021; 13

Sakamoto JM, Silva Diaz GE, Wagner EA. Bacterial Communities of *Ixodes scapularis* from Central Pennsylvania, USA. *Insects* 2020; 11: 718.

Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, Turner P, Parkhill J, Loman NJ, Walker AW. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biology* 2014; 12: 87.

Sassera D, Beninati T, Bandi C, Bouman EAP, Sacchi L, Fabbi M, Lo N. ‘*Candidatus* Midichloria mitochondrii’, an endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006; 56: 2535-2540.

Sassera D, Lo N, Epis S, D'Auria G, Montagna M, Comandatore F, Horner D, Peretó J, Luciano AM, Franciosi F, Ferri E, Crotti E, Bazzocchi C, Daffonchio D, Sacchi L, Moya A, Latorre A, Bandi C. Phylogenomic Evidence for the Presence of a Flagellum and *cbb3* Oxidase in the Free-Living Mitochondrial Ancestor. *Molecular Biology and Evolution* 2011; 28: 3285-3296.

Schloss PD. The effects of alignment quality, distance calculation method, sequence filtering, and region on the analysis of *16S rRNA* gene-based studies. *PLOS Computational Biology* 2010; 6

Schoeler GB, Wikel SK. Modulation of host immunity by haematophagous arthropods. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2001; 95: 755-771.

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

Schwan TG, Piesman J, Golde WT, Dolan MC, Rosa PA. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 1995; 92: 2909-2913.

Schwan TG, Piesman J. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38: 382-388.

Sertour N, Cotté V, Garnier M, Malandrin L, Ferquel E, Choumet V. Infection Kinetics and Tropism of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Mouse After Natural (via Ticks) or Artificial (Needle) Infection Depends on the Bacterial Strain. *Frontiers in Microbiology* 2018; 9

Severo MS, Pedra JHF, Ayllón N, Kocan KM, de la Fuente J. *Anaplasma*. In: *Molecular Medical Microbiology*: Elsevier 2015: 2033-2042.

Shanahan F, Ghosh TS, O'Toole PW. The Healthy Microbiome - What Is the Definition of a Healthy Gut Microbiome? *Gastroenterology* 2021; 160: 483-494.

Shannon CE. A mathematical theory of communication. *Mobile Computing and Communications Review* 2001; 5: 3-55.

Shaw EI, Voth DE. *Coxiella burnetii*: A Pathogenic Intracellular Acidophile. *Microbiology* 2019; 165: 1-3.

Shaw WR, Catteruccia F. Vector biology meets disease control: using basic research to fight vector-borne diseases. *Nature Microbiology* 2019; 4: 20-34.

Shih CM, Spielman A. Accelerated transmission of Lyme disease spirochetes by partially fed vector ticks. *Journal of Clinical Microbiology* 1993; 31: 2878-2881.

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

Simpson EH. Measurement of Diversity. *Nature* 1949; 163: 688.

Skinner KM, Underwood J, Ghosh A, Oliva Chavez AS, Brelsfoard CL. *Wolbachia* Impacts *Anaplasma* Infection in *Ixodes scapularis* Tick Cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2022; 19: 1051.

Sojka D, Franta Z, Horn M, Caffrey CR, Mareš M, Kopáček P. New insights into the machinery of blood digestion by ticks. *Trends in Parasitology* 2013; 29: 276-285.

Sonenshine DE, Ceraul SM, Hynes WE, Macaluso KR, Azad AF. Expression of defensin-like peptides in tick hemolymph and midgut in response to challenge with *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Experimental and Applied Acarology* 2002; 28: 127-134.

Sonenshine DE. Pheromones and other semiochemicals of ticks and their use in tick control. *Parasitology* 2004; 129: 405-425.

Sonenshine DE, Anderson JM, Roe RM. Mouthparts and digestive system. *Biology of ticks* 2014; 1: 122-162.

Sonenshine DE, Roe RM (2014) *Biology of tick*. Oxford University Press

Sonenshine DE, Macaluso KR. Microbial Invasion vs. Tick Immune Regulation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2017; 7: 390.

Špitalská E, Sparagano O, Stanko M, Schwarzová K, Špitalský Z, Škultéty L, Havlíková SF. Diversity of *Coxiella*-like and *Francisella*-like endosymbionts, and *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii* as pathogens in the tick populations of Slovakia, Central Europe. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2018; 9: 1207-1211.

Springer A, Raulf MK, Fingerle V, Strube C. *Borrelia* prevalence and species distribution in ticks removed from humans in Germany, 2013-2017. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2020; 11

Stacy A, Andrade-Oliveira V, McCulloch JA, Hild B, Oh JH, Perez-Chaparro PJ, Sim CK, Lim AI, Link VM, Enamorado M, Trinchieri G, Segre JA, Rehermann B, Belkaid Y. Infection trains the host for microbiota-enhanced resistance to pathogens. *Cell* 2021; 184: 615-627.

Stanek G, Klein J, Bittner R, Glogar D. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from the myocardium of a patient with longstanding cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine* 1990; 322: 249-252.

Stavru F, Riemer J, Jex A, Sassera D. When bacteria meet mitochondria: The strange case of the tick symbiont *Midichloria mitochondrii*. *Cellular Microbiology* 2020; 22

Steere AC, Broderick TF, Malawista SE. *Erythema chronicum migrans* and Lyme arthritis: epidemiologic evidence for a tick vector. *American Journal of Epidemiology* 1978; 108: 312-321.

Steere AC, Schoen RT, Taylor E. The clinical evolution of Lyme arthritis. *Annals of Internal Medicine* 1987; 107: 725-731.

Steere AC. Lyme Disease. *New England Journal of Medicine* 2001; 345: 115-125.

Steele AC, Strle F, Wormser GP, Hu LT, Branda JA, Hovius JWR, Li X, Mead PS. Lyme borreliosis. *Nature Reviews Disease Primers* 2016; 2

Stewart PE, Bloom ME. Sharing the Ride: *Ixodes scapularis* Symbionts and Their Interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2020; 10

Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *The BMJ* 1989; 299: 1259-1260.

Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. *Anaplasma phagocytophilum* -a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2013; 3: 31.

Subramanian G, Sekeyova Z, Raoult D, Mediannikov O. Multiple tick-associated bacteria in *Ixodes ricinus* from Slovakia. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2012; 3: 406-410.

Suchodolski JS. Analysis of the gut microbiome in dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology* 2022; 50 Suppl 1: 6-17.

Sukumaran B, Narasimhan S, Anderson JF, DePonte K, Marcantonio N, Krishnan MN, Fish D, Telford SR, Kantor FS, Fikrig E. An *Ixodes scapularis* protein required for survival of *Anaplasma phagocytophilum* in tick salivary glands. *Journal of Experimental Medicine* 2006; 203: 1507-1517.

Tappe J, Strube C. *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. infections in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the city of Hanover (Germany): Revisited. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2013; 4: 432-438.

Tatchell RJ, Araman SF, Boctor FN. Biochemical and physiological studies of certain ticks (ixodoidea). *Zeitschrift für Parasitenkunde* 1972; 39: 345-350.

Telford III SR, Dawson JE, Katavolos P, Warner CK, Kolbert CP, Persing DH. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93: 6209-6214.

Thapa S, Zhang Y, Allen MS. Effects of temperature on bacterial microbiome composition in *Ixodes scapularis* ticks. *MicrobiologyOpen* 2019; 8

The Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. The Integrative Human Microbiome Project. *Nature* 2019; 569: 641-648.

Thomas T, Gilbert J, Meyer F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation* 2012; 2: 3.

Tokarz R, Tagliafierro T, Sameroff S, Cucura DM, Oleynik A, Che X, Jain K, Lipkin WI. Microbiome analysis of *Ixodes scapularis* ticks from New York and Connecticut. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2019; 10: 894-900.

Tolle MA. Mosquito-borne Diseases. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care* 2009; 39: 97-140.

Tourlousse DM, Narita K, Miura T, Ohashi A, Matsuda M, Ohyama Y, Shimamura M, Furukawa M, Kasahara K, Kameyama K, Saito S, Goto M, Shimizu R, Mishima R, Nakayama J, Hosomi K, Kunisawa J, Terauchi J, Sekiguchi Y, Kawasaki H. Characterization and Demonstration of Mock Communities as Control Reagents for Accurate Human Microbiome Community Measurements. *Microbiology Spectrum* 2022; 10

Trentelman JJA, Tomás-Cortázar J, Knorr S, Barriaes D, Hajdusek O, Sima R, Ersoz JI, Narasimhan S, Fikrig E, Nijhof AM, Anguita J, Hovius JW. Probing an *Ixodes ricinus* salivary gland yeast surface display with tick-exposed human sera to identify novel candidates for an anti-tick vaccine. *Scientific Reports* 2021; 11

Troese MJ, Carlyon JA. *Anaplasma phagocytophilum* Dense-Cored Organisms Mediate Cellular Adherence through Recognition of Human P-Selectin Glycoprotein Ligand 1. *Infection and Immunity* 2009; 77: 4018-4027.

Tseng CH, Wu CY. The gut microbiome in obesity. *Journal of the Formosan Medical Association* 2019; 118 Suppl 1: 3-9.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The Human Microbiome Project. *Nature* 2007; 449: 804-810.

Tyson K, Elkins C, Patterson H, Fikrig E, de Silva A. Biochemical and functional characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* tick salivary protein that inhibits the complement pathway. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2007; 16: 469-479.

Van Oosterwijk JG, Wikel SK. Resistance to Ticks and the Path to Anti-Tick and Transmission Blocking Vaccines. *Vaccines* 2021; 9: 725.

Van Tol S, Dimopoulos G. Influences of the Mosquito Microbiota on Vector Competence. In: *Advances in Insect Physiology*. Raikhel AS, ed.: Academic Press 2016: 243-291.

Van Treuren W, Ponnusamy L, Brinkerhoff RJ, Gonzalez A, Parobek CM, Juliano JJ, Andreadis TG, Falco RC, Ziegler LB, Hathaway N, Keeler C, Emch M, Bailey JA, Roe RM, Apperson CS, Knight R, Meshnick SR. Variation in the Microbiota of *Ixodes* Ticks with Regard to Geography, Species, and Sex. *Applied and Environmental Microbiology* 2015; 81: 6200-6209.

Wächter M, Wölfel S, Pfeffer M, Dobler G, Kohn B, Moritz A, Pachnicke S, Silaghi C. Serological differentiation of antibodies against *Rickettsia helvetica*, *R. raoultii*, *R. slovaca*, *R. monacensis* and *R. felis* in dogs from Germany by a micro-immunofluorescent antibody test. *Parasites & Vectors* 2015; 8: 126.

Wallménius K, Barboutis C, Fransson T, Jaenson TG, Lindgren PE, Nyström F, Olsen B, Salaneck E, Nilsson K. Spotted fever *Rickettsia* species in *Hyalomma* and *Ixodes* ticks infesting migratory birds in the European Mediterranean area. *Parasites & Vectors* 2014; 7: 318.

Wan Sulaiman WA, Kamtchum-Tatuene J, Mohamed MH, Ramachandran V, Ching SM, Sazlly Lim SM, Hashim HZ, Inche Mat LN, Hoo FK, Basri H. Anti-*Wolbachia* therapy for onchocerciasis & lymphatic filariasis: Current perspectives. *Indian Journal of Medicine Research* 2019; 149: 706-714.

Wang H, Nuttall PA. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology* 1994; 109 (Pt 4): 525-530.

Weeks AR, Reynolds KT, Hoffmann AA. *Wolbachia* dynamics and host effects: what has (and has not) been demonstrated? *Trends in Ecology & Evolution* 2002; 17: 257-262.

Wenderlein J, Boswald LF, Ulrich S, Kienzle E, Neuhaus K, Lagkouvardos I, Zenner C, Straubinger RK. Processing Matters in Nutrient-Matched Laboratory Diets for Mice-Microbiome. *Animals* 2021; 11

Werner M, Suchodolski JS, Lidbury JA, Steiner JM, Hartmann K, Unterer S. Diagnostic value of fecal cultures in dogs with chronic diarrhea. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2021; 35: 199-208.

Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuire A, He W, Chen Y-J, Makhijani V, Roth GT, Gomes X, Tartaro K, Niazi F, Turcotte CL, Irzyk GP, Lupski JR, Chinault C, Song X-Z, Liu Y, Yuan Y, Nazareth L, Qin X, Muzny DM, Margulies M, Weinstock GM, Gibbs RA, Rothberg JM. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* 2008; 452: 872-876.

Whipps J, Lewis K, Cooke R. Mycoparasitism and plant disease control. *Fungi in biological control systems* 1988: 161-187.

Whiteside SA, Razvi H, Dave S, Reid G, Burton JP. The microbiome of the urinary tract - a role beyond infection. *Nature Reviews Urology* 2015; 12: 81-90.

Wiesinger A, Wenderlein J, Ulrich S, Hiereth S, Chitimia-Dobler L, Straubinger RK. Revealing the Tick Microbiome: Insights into Midgut and Salivary Gland Microbiota of Female *Ixodes ricinus* Ticks. *International Journal of Molecular Sciences* 2023; 24

Wikel SK. Histamine content of tick attachment sites and the effects of H1 and H2 histamine antagonists on the expression of resistance. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1982; 76: 179-185.

Willadsen P. Novel vaccines for ectoparasites. *Veterinary Parasitology* 1997; 71: 209-222.

Wölfel R, Terzioglu R, Kiessling J, Wilhelm S, Essbauer S, Pfeffer M, Dobler G. *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* Ticks in Bavaria, Germany. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 1078: 509-511.

Wu-Chuang A, Hodžić A, Mateos-Hernández L, Estrada-Peña A, Obregon D, Cabezas-Cruz A. Current debates and advances in tick microbiome research. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases* 2021; 1

Wu-Chuang A, Obregon D, Mateos-Hernández L, Cabezas-Cruz A. Anti-tick microbiota vaccines: how can this actually work? *Biologia* 2022; 77: 1555-1562.

Wu M, Sun LV, Vamathevan J, Riegler M, Deboy R, Brownlie JC, McGraw EA, Martin W, Esser C, Ahmadinejad N, Wiegand C, Madupu R, Beanan MJ, Brinkac LM, Daugherty SC, Durkin AS, Kolonay JF, Nelson WC, Mohamoud Y, Lee P, Berry K, Young MB, Utterback T, Weidman J, Nierman WC, Paulsen IT, Nelson KE, Tettelin H, O'Neill SL, Eisen JA. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biology* 2004; 2: 69.

Yang X, Goldberg MS, Popova TG, Schoeler GB, Wikel SK, Hagman KE, Norgard MV. Interdependence of environmental factors influencing reciprocal patterns of gene expression in virulent *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology* 2000; 37: 1470-1479.

Yang X, Smith AA, Williams MS, Pal U. A dityrosine network mediated by dual oxidase and peroxidase influences the persistence of Lyme disease pathogens within the vector. *Journal of Biological Chemistry* 2014; 289: 12813-12822.

Yang X, Koči J, Smith AA, Zhuang X, Sharma K, Dutta S, Rana VS, Kitsou C, Yas OB, Mongodin EF, Pal U. A novel tick protein supports integrity of gut peritrophic matrix impacting existence of gut microbiome and Lyme disease pathogens. *Cellular Microbiology* 2021; 23

Yang XF, Pal U, Alani SM, Fikrig E, Norgard MV. Essential role for OspA/B in the life cycle of the Lyme disease spirochete. *Journal of Experimental Medicine* 2004; 199: 641-648.

Yeni DK, Büyük F, Ashraf A, Shah M. Tularemia: a re-emerging tick-borne infectious disease. *Folia Microbiologica* 2021; 66: 1-14.

Yu D, Du J, Pu X, Zheng L, Chen S, Wang N, Li J, Chen S, Pan S, Shen B. The Gut Microbiome and Metabolites Are Altered and Interrelated in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2022; 11

Zhang K, Bian J, Deng Y, Smith A, Nunez RE, Li MB, Pal U, Yu A-M, Qiu W, Ealick SE, Li C. Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi* does not require thiamin. *Nature Microbiology* 2016; 2

Zhang R, Yu G, Huang Z, Zhang Z. Microbiota assessment across different developmental stages of *Dermacentor silvarum* (Acari: Ixodidae) revealed stage-specific signatures. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2020; 11

Zhu Z, Gern L, Aeschlimann A. The peritrophic membrane of *Ixodes ricinus*. Parasitology Research 1991; 77: 635-641.

Zinsstag J, Schelling E, Crump L, Whittaker M, Tanner M, Stephen C (2020) One Health: the theory and practice of integrated health approaches. CABI

Zolnik CP, Prill RJ, Falco RC, Daniels TJ, Kolokotronis SO. Microbiome changes through ontogeny of a tick pathogen vector. Molecular Ecology 2016; 25: 4963-4977.

Zubriková D, Wittmann M, Hönig V, Švec P, Víchová B, Essbauer S, Dobler G, Grubhoffer L, Pfister K. Prevalence of tick-borne encephalitis virus and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks in Lower Bavaria and Upper Palatinate, Germany. Ticks and Tick-borne Diseases 2020; 11

VIII. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Straubinger für die Auswahl des sehr interessanten Themas und die Betreuung der Doktorarbeit. Ihre ruhige und bedachte Herangehensweise an wissenschaftliche Fragestellungen sowie Ihre Vermittlung von Kompetenz und Wissen habe ich immer bewundert.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Betreuern Dr. Jasmin Wenderlein und Dr. Sebastian Ulrich für die fachliche Betreuung während meiner Labortätigkeiten, der bioinformatischen Auswertung und Anfertigung der Publikation bedanken.

Ich danke all meinen Kollegen am Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie für die Zusammenarbeit und die schöne Zeit. Vor allem möchte ich Stephanie Hiereth für ihre Einarbeitung im Labor, ihre mehr als exakte Arbeitsweise und Betreuung der Labortätigkeiten danken. Allen Doktoranden und Freunden Eva, Katharina, Katharina, Katharina, Cornelia, Isabell, Christoph, Sebastian, Anke und Astrid möchte ich für den wissenschaftlichen Austausch, ihre Unterstützung und die witzige Arbeitsatmosphäre danken.

Ein weiterer Dank geht an Dr. Muschler, der mir viele hilfreiche Tipps für die DNA-Extraktion geben konnte und mich in der Erstellung des Protokolls unterstützte. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Klaus Neuhaus und seinen Kollegen Dr. Ilias Lagkouvardos, Lukas Mix und Romy Wecko vom ZIEL-Institut bedanken für ihre Kooperation und ihre Unterstützung in der bioinformatischen Auswertung.

Bei meiner Familie bedanke ich mich vor allem bei meiner Mutter für den unermüdlichen Einsatz bei der Zeckensuche, für das Verständnis und für die mentale Unterstützung. Ich danke meinem Vater für den stetigen Rückhalt, den Appell an meine Disziplin und die nötige Remotivation. Danke für Eure Geduld, für Eure Hilfe und dafür, dass ihr mir alles in meinem Leben ermöglicht.

Ein großer Dank gilt an die Unterstützung von Pia, Katharina und Dani. Ohne euch und unsere tiefe Freundschaft wäre das Studium und diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Ein weiteres großes Dankeschön geht an Mali und Franzi für die Korrekturen, Anmerkungen und stetige Unterstützung. Danke, dass ihr immer für mich da seid.