

Institut für Medizinische Mikrobiologie
Universitätsklinikum Jena
Direktor: Prof. Dr. Eberhard Straube

Bedeutung des Vektors *Ixodes ricinus* und verschiedener Wirte im Transmissionszyklus zeckenassoziierter Pathogene

kumulative Habilitationsschrift

vorgelegt am 06. Dezember 2010
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dr. med. Anke Hildebrandt

aus Gotha

Gutachter

1. Prof. Dr. Eberhard Straube, Jena

2. Prof. Dr. Jochen Gensichen, Jena

3. Prof. Dr. Gerold Stanek, Wien

Erteilung der Lehrbefähigung am 17.11.2011

gewidmet meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
Verzeichnis der zugrunde liegenden Originalarbeiten	VII
1. Einführung	1
1.1 Der Vektor <i>Ixodes ricinus</i>	1
1.2 Zeckenassoziierte Pathogene	3
1.2.1 <i>Borrelia</i> spp.	3
1.2.1 <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	4
1.2.3 <i>Rickettsia</i> spp.	5
1.2.4 <i>Babesia</i> spp.	5
1.2.5 <i>Coxiella burnetii</i>	6
1.2.6 <i>Francisella tularensis</i>	7
1.3 Wirtssuchende und parasitierende <i>Ixodes ricinus</i> Zecken verschiedener Gebiete	8
2. Prävalenz und Heterogenität von <i>Borrelia</i> spp.....	11
3. Prävalenz verschiedener <i>emerging pathogens</i>	19
3.1 <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	19
3.2 <i>Rickettsia</i> spp.	24
3.3 <i>Babesia</i> spp.	28
3.4 Bedeutung der besprochenen <i>emerging pathogens</i> in Europa.....	35
3.4.1 Humane granulozytäre Anaplasmosose	35
3.4.2 Humane Rickettsiose	36
3.4.3 Humane Babesiose.....	37
3.5 Selten in <i>Ixodes ricinus</i> Zecken nachgewiesene <i>emerging pathogens</i>	39
3.5.1 <i>Coxiella burnetii</i>	39
3.5.2 <i>Francisella tularensis</i>	40
3.5.3 <i>Bartonella</i> spp.....	42

4. Koinfektionen	43
5. Zusammenfassung und Ausblick	49
6. Literatur	52
7. Danksagung	66
8. Anlagen.....	VIII
Lebenslauf.....	VIII
Ehrenwörtliche Erklärung.....	IX
Originalarbeit 1	OAFehler! Textmarke nicht definiert.
Originalarbeit 2	OAFehler! Textmarke nicht definiert.
Originalarbeit 3	OAFehler! Textmarke nicht definiert.
Originalarbeit 4	OAFehler! Textmarke nicht definiert.
Originalarbeit 5	OAFehler! Textmarke nicht definiert.
Originalarbeit 6	OAFehler! Textmarke nicht definiert.
Originalarbeit 7	OAFehler! Textmarke nicht definiert.
Originalarbeit 8	OAFehler! Textmarke nicht definiert.
Originalarbeit 9	OAFehler! Textmarke nicht definiert.
Originalarbeit 10	OAFehler! Textmarke nicht definiert.
Originalarbeit 11	OAFehler! Textmarke nicht definiert.
Originalarbeit 12	OAFehler! Textmarke nicht definiert.
Originalarbeit 13	OAFehler! Textmarke nicht definiert.
Originalarbeit 14	OAFehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 2: Lage der Untersuchungsgebiete	9
Abb. 3: Zeckenentnahme bei einem Rotkehlchen.....	10
Abb. 4: Spektrum der Borrelien-Genospezies und OspA-Typen in wirtssuchenden und parasitierenden <i>I. ricinus</i> Zecken	18
Abb. 5: Saisonales Muster der Infektionen im Zeitgrund	23
Abb. 6: Prävalenz der <i>emerging pathogens</i> <i>A. phagocytophilum</i> , <i>Rickettsia</i> spp. und <i>Babesia</i> spp. in wirtssuchenden und parasitierenden <i>I. ricinus</i> Zecken	34
Abb. 7: <i>Babesia microti</i> -Infektion: Giemsa-gefärbter Blutaussstrich	38
Abb. 8: Koinfektionen in vogel- und kleinsäugerassoziierten Zecken	48
Tab. 1: Charakterisierung der Borrelien-Genospezies und OspA-Typen.....	13
Tab. 2: Koch'sche Postulate für den Beweis der Infektionsätiologie einer Krankheit.....	37
Tab. 3: <i>Babesia microti</i> -Infektion: Verlauf der Parasitämie, PCR und Serologie.....	38
Tab. 4: Verteilung der Borrelien- und Babesienspezies in den Koinfektionen der Freilandzecken aus dem Zeitgrund.....	46

Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Anaplasma</i>
Acc.-Nr.	Accession-Nummer entsprechend dem <i>National Center for Biotechnology Information</i> (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
B.	<i>Borrelia</i> oder <i>Babesia</i> je nach Bedeutung des folgenden Wortes:
	<i>Borrelia</i> : <i>B. afzelii</i> <i>Borrelia afzelii</i>
	<i>B. bavariensis</i> <i>Borrelia bavariensis</i>
	<i>B. bissettii</i> <i>Borrelia bissettii</i>
	<i>B. burgdorferi</i> <i>Borrelia burgdorferi</i>
	<i>B. caporalei</i> <i>Borrelia caporalei</i>
	<i>B. finlandensis</i> <i>Borrelia finlandensis</i>
	<i>B. garinii</i> <i>Borrelia garinii</i>
	<i>B. kurtenbachii</i> <i>Borrelia kurtenbachii</i>
	<i>B. lusitaniae</i> <i>Borrelia lusitaniae</i>
	<i>B. spielmanii</i> <i>Borrelia spielmanii</i>
	<i>B. valaisiana</i> <i>Borrelia valaisiana</i>
	<i>Babesia</i> : <i>B. divergens</i> <i>Babesia divergens</i>
	<i>B. microti</i> <i>Babesia microti</i>
	<i>B. gibsoni</i> <i>Babesia gibsoni</i>
	<i>B. duncani</i> <i>Babesia duncani</i>
	<i>B. venatorum</i> <i>Babesia venatorum</i> , <i>Babesia</i> sp. EU1
	<i>B. canis</i> <i>Babesia canis</i>
	<i>B. bovis</i> <i>Babesia bovis</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Coxiella</i>
ca.	zirka
cm	Zentimeter
D.	<i>Dermacentor</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.	<i>Ehrlichia</i>

EBM	Evidenz-basierte Medizin
EID	neue Infektionskrankheiten, <i>emerging infectious diseases</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EM	Erythema migrans
et al.	und andere
EUCALB	<i>European Concerted Action on Lyme Borreliosis</i> , http://www.oeghmp.at/eucalb/
EU1	<i>Babesia</i> sp. EU1, <i>Babesia venatorum</i> , EU1 steht für <i>European Union 1</i>
e.V.	eingetragener Verein
<i>F.</i>	<i>Francisella</i>
g	Gramm
GE	genomisches Äquivalent
GILEAD	Projekt: „ <i>German investigation on Lyme Borreliosis: evaluation of therapeutic and diagnostic cost</i> “ zur Charakterisierung der Krankheitslast und der medizinischen Kosten der Lyme Borreliose
<i>gltA</i>	Zitratsynthase-Gen
<i>H.</i>	<i>Haemaphysalis</i>
ha	Hektar
HGA	Humane granulozytäre Anaplasnose
HMA	Humane monozytäre Anaplasnose
<i>I.</i>	<i>Ixodes</i>
ICD	Internationale Klassifikation der Krankheiten
IFT	Immunfluoreszenztest
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
kDa	Kilodalton
KO1	<i>Babesia</i> -Spezies, die erstmals in Korea beschrieben ist
LB	Lyme Borreliose
mm	Millimeter
n	Anzahl
n.i.	nicht identifizierbar
OA	Originalarbeit

Osp	<i>outer surface protein</i>
<i>p</i>	Wahrscheinlichkeit
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>R.</i>	<i>Rickettsia</i>
Real-Time	Real-Time PCR: quantitative Echtzeit-PCR
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RKI	Robert-Koch-Institut
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SFG	Zeckenbissfiebergruppe, <i>spotted fever group</i>
sp.	Spezies einer Gattung, Singular
spp.	Spezies einer Gattung, Plural
ssp.	Subspezies, Singular
TG	Typhusgruppe, <i>typhus group</i>
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VlsE	Borrelien-spezifisches Antigen: <i>variable major-protein-like sequence expression site</i>
z.B.	zum Beispiel

Verzeichnis der zugrunde liegenden Originalarbeiten

- Originalarbeit 1: **Hildebrandt A, Schmidt KH, Fingerle V, Wilske B, Straube E.** 2002. Prevalence of granulocytic *Ehrlichiae* in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany (Thuringia) detected by PCR and sequencing of a 16S ribosomal DNA fragment. FEMS Microbiology Letters, 211:225-230. OA1 - S. 1-6
- Originalarbeit 2: **Hildebrandt A, Schmidt KH, Wilske B, Dorn W, Straube E, Fingerle V.** 2003. Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and coinfection with *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes ricinus* ticks in Central Germany (Thuringia). Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 22:364-367. OA2 - S. 1-4
- Originalarbeit 3: **Hildebrandt A, Hunfeld KP, Baier M, Krumbholz A, Sachse S, Lorenzen T, Kiehnkopf M, Fricke HJ, Straube E.** 2007. First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 26:595-601. OA3 - S. 1-7
- Originalarbeit 4: **Hildebrandt A, Tenter AM, Straube E, Hunfeld KP.** 2008. Human Babesiosis in Germany: Just overlooked or truly new? Int J Med Microbiol, 298 (Suppl 1):336-346. OA4 - S. 1-11
- Originalarbeit 5: **Hildebrandt A, Pauliks K, Sachse S, Straube E.** 2010a. Coexistence of *Borrelia* spp. and *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany. Vector Borne Zoonotic Dis, 10:831-837. OA5 - S. 1-7
- Originalarbeit 6: **Hildebrandt A, Krämer A, Sachse S, Straube E.** 2010b. Detection of *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia). Ticks Tick-borne Dis, 1:52-56. OA6 - S. 1-5
- Originalarbeit 7: **Hildebrandt A, Franke J, Meier F, Sachse S, Dorn W, Straube E.** 2010c. The role of migratory birds in transmission cycles of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. Ticks Tick-borne Dis, 1:105-107. OA7 - S. 1-3
- Originalarbeit 8: **Hildebrandt A, Fritzsche J, Franke J, Sachse S, Dorn W, Straube E.** 2011a. Co-circulation of emerging tick-borne pathogens in Middle Germany. Vector Borne Zoonotic Dis, 11:533-537. OA8 - S. 1-5
- Originalarbeit 9: **Hildebrandt A, Straube E, Neubauer H, Schmoock G.** 2011b. *Coxiella burnetii* in *Ixodes ricinus* ticks, Germany. Vector-Borne Zoonotic Dis, 11:1205-1207. OA9 - S. 1-3
- Originalarbeit 10: **Hildebrandt A, Franke J, Schmoock G, Pauliks K, Krämer A, Straube E.** 2011c. Diversity and co-existence of tick-borne pathogens in Central Germany. J Med Entomol, 48: 651-655. OA10 - S. 1-6
- Originalarbeit 11: **Franke J, Fritzsche J, Tomaso H, Straube E, Dorn W, Hildebrandt A.** 2010a. Co-existence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat of Central Germany. Appl Environ Microbiol, 76:6829-6836. OA11 - S. 1-8
- Originalarbeit 12: **Franke J, Moldenhauer A, Hildebrandt A, Dorn W.** 2010b. Are birds reservoir hosts for *Borrelia afzelii*? Ticks Tick-borne Dis, 1:109-112. OA12 - S. 1-4
- Originalarbeit 13: **Franke J, Meier F, Moldenhauer A, Straube E, Dorn W, Hildebrandt A.** 2010c. Established and emerging pathogens in *Ixodes ricinus* ticks collected from birds on a conservation island in the Baltic Sea. Med Vet Entomol, 24:425-432. OA13 - S. 1-8
- Originalarbeit 14: **Welc-Fałęciak R, Hildebrandt A, Siński E.** 2010. Co-infection with *Borrelia* species and other tick-borne pathogens in humans: two cases from Poland. Ann Agric Environ Med, 17:63-67. OA14 - S. 1-5

1. Einführung

1.1 Der Vektor *Ixodes ricinus*

Zecken sind obligate Ektoparasiten, die bereits seit 200 Millionen Jahren existieren und weltweit zu den wichtigsten Überträgern von Krankheitserregern des Menschen zählen. Sie gehören zu den ältesten Arthropoden und bilden innerhalb der Klasse der Spinnentiere (Arachnida) und der Unterklasse der Milben/Zecken (Acari) eine Überfamilie (Ixodoidea). Es werden Lederzecken (Argasidae) und Schildzecken (Ixodidae) unterschieden, sowie die in Afrika vorkommende Familie Nuttalliellidae (einzige Art: *Nuttalliella namaqua*) (Sonnenshine, 1992). In Europa sind Lederzecken der Gattungen *Argas* und *Ornithodoros* sowie die Schildzecken *Ixodes*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma* und *Rhipicephalus* Vektoren und auch Reservoirre verschiedener Krankheitserreger (Stanek, 2009). Innerhalb der Schildzecken existieren mehr als 300 Arten, von denen in Mitteleuropa der gemeine Holzbock (*Ixodes ricinus*) mit 90%-igem Anteil an der Gesamtpopulation am häufigsten vertreten ist (Eisen und Lane, 2002).

Ixodes ricinus kommt vor allem in Parkanlagen, Laub- und Mischwäldern sowie an Wald-rändern vor. Die Abundanz hängt von einer Vielzahl biotischer und abiotischer Faktoren ab (Randolph, 2001; Gray et al., 2002). Der Verlauf der Zeckenaktivität mit uni- oder bimodalem Aktivitätsmuster ist stark von den klimatischen Bedingungen bestimmt (Gray, 1984; Eisen und Lane, 2002; Gray et al., 2009). In den letzten Jahren dehnte sich das Verbreitungsgebiet von *I. ricinus* zunehmend nach Norden aus, die vertikale Grenze des Vorkommens dieser Spezies stieg um mehrere hundert Meter und es traten Abweichungen der saisonalen Aktivitätsverläufe auf (Materna et al., 2005; Bennet et al., 2006; Dautel et al., 2008; Gilbert, 2009). Auch andere Zeckenarten erweitern ihr Verbreitungsgebiet in Europa, z.B. *Dermacentor* spp., u.a. Vektoren für Rickettsien, Coxiellen und Babesien oder *Hyalomma marginatum*, Vektor des Krim-Kongo-hämorrhagischen Fieber Virus. Ursachen dieser Beobachtungen sind zum Teil die unvorhersehbaren Klimaveränderungen (Gray et al., 2009).

Der Entwicklungszyklus der Schildzecken durchläuft 3 Stadien (Larve - Nymphe - adulte Zecke) und umfasst ein großes Wirtsspektrum von mehr als 300 Wirbeltierarten (Stanek, 2009). Für den Übergang in das nächste Entwicklungsstadium ist jeweils eine Blutmahlzeit mit anschließender Häutung erforderlich (Abb. 1). Beim Saugakt können die Zecken Pathogene sowohl von infizierten Reserviertieren aufnehmen als auch auf Wirtstiere übertra-

gen. Innerhalb der Zecke ist eine transovariable und transstadielle Erregerübertragung möglich.

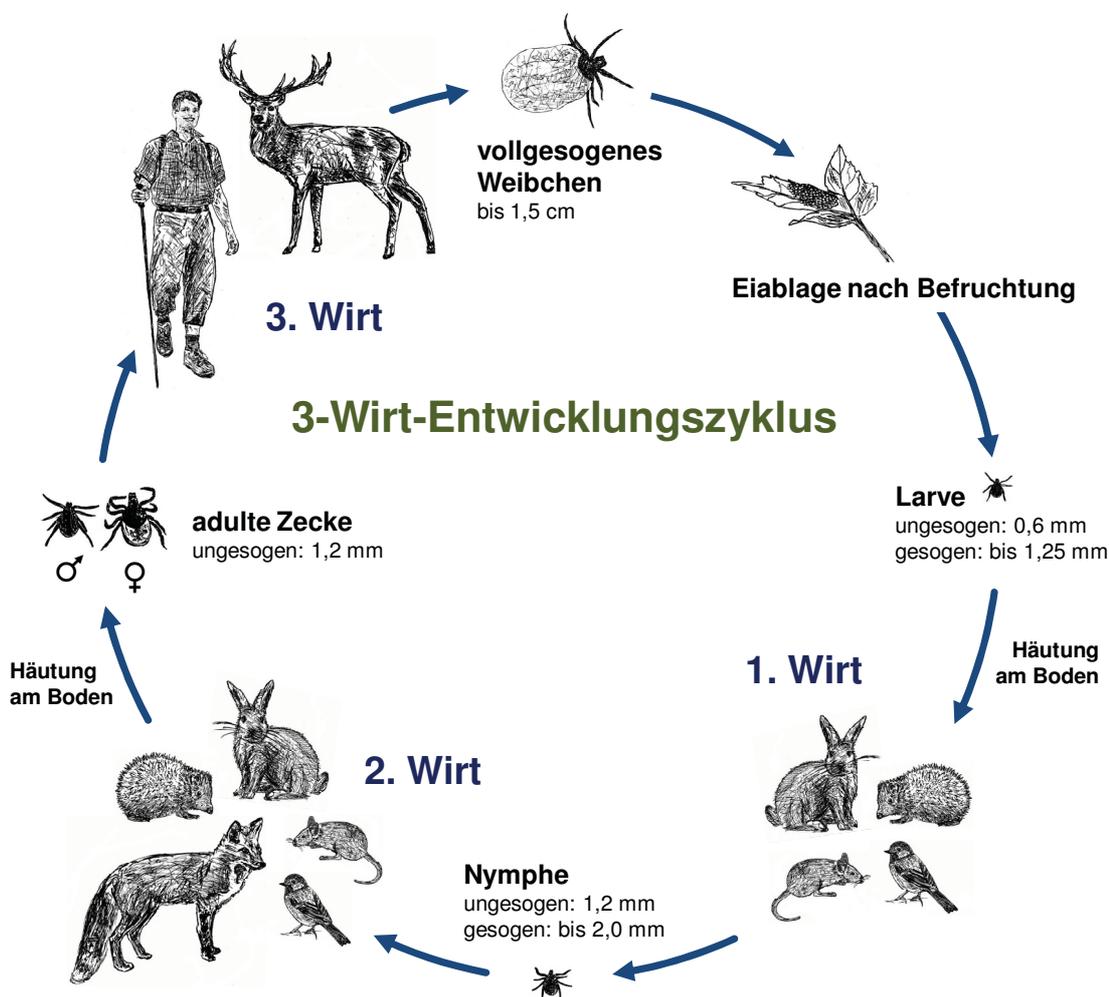


Abb. 1: 3-Wirt-Entwicklungszyklus von *I. ricinus*

Larven bewohnen die unteren Vegetationsschichten bis zu einer Höhe von 20 cm und saugen v.a. an Kleinsäugetern sowie an bodenbewohnenden Vögeln und Reptilien. Nymphen sind in Vegetationsschichten von 30 bis 60 cm Höhe zu finden und bevorzugen mittelgroße Säugetiere und Vögel als Wirte. Die adulten Stadien halten sich in einer Höhe bis 150 cm auf, ihre Hauptwirte sind daher große Säugetiere wie Rotwild, Weidevieh oder Hunde. Weibliche Tiere benötigen zur Reproduktion eine dritte Blutmahlzeit; nach der Befruchtung legen die Weibchen etwa 3 000 Eier, aus denen sich erneut Larven entwickeln. Unter optimalen klimatischen Bedingungen durchlaufen die Zecken den geschilderten Entwicklungszyklus in 3 Jahren, wobei jedes Entwicklungsstadium (Larve - Nympe - adulte Zecke) 1 Jahr beansprucht. Die Zykluslänge kann allerdings zwischen 2 und 6 Jahren variieren (Gray, 1991).

Es gibt verschiedene zeitliche und räumliche Aspekte eines nicht systemischen Transmissionsweges, also der Möglichkeit einer Zecke, ein Pathogen beim Saugen an einem Wirt aufzunehmen, ohne dass beim Wirtsorganismus eine systemische Infektion nachweisbar ist. Dabei kann eine Zecke ein Pathogen durch gleichzeitiges Saugen mit einer infizierten

Zecke (*co-feeding*) an einem Wirt erwerben, selbst wenn ein gewisser räumlicher Abstand zwischen beiden besteht. Dieser Weg der Übertragung ist typisch für virale Erreger wie das FSME-Virus, da infizierte Wirtszellen Viren im lymphatischen System transportieren können. Bei einer Form des prolongierten *co-feeding* kann sich eine Zecke an einer lokalisierten Saugstelle infizieren, an der ebenfalls eine infizierte Zecke saugt oder zuvor saugte, auch wenn sie den Wirt bereits wieder verlassen hat. Dieser Mechanismus ist z.B. für Borrelien nachgewiesen. Borrelien sind auf ihre eigene Motilität angewiesen, wodurch die Disseminierung mehr Zeit beansprucht (Montgomery und Malawista, 1994). Ideale Bedingungen für den Übertragungsweg des *co-feeding* bestehen v.a. bei Kleinsäugetern, bei denen zumeist eine große Anzahl Larven sowie einzelne Nymphen im Bereich der Ohren saugen (Randolph et al., 1996).

Als Reservoirkompetenz bezeichnet man die Fähigkeit eines Wirtstieres, parasitierende Zecken zu infizieren. Die jeweiligen Pathogene müssen sich dazu im Wirt vermehren und zur Bakteriämie, Parasitämie bzw. Virämie führen. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, eine Reservoirkompetenz nachzuweisen. Untersucht man Zecken und analysiert die Blutmahlzeit, lassen sich anhand der ebenfalls enthaltenen Wirts-DNA Rückschlüsse auf den Wirtsorganismus ziehen (Gray et al., 1999; Pichon et al., 2003). Die Xenodiagnostik ermöglicht eine Untersuchung gesogener Zeckenlarven gleich im Anschluss an eine Blutmahlzeit an einem infizierten Wirtstier (Huegli et al. 2002; Hu et al. 2003).

1.2 Zeckenassoziierte Pathogene

1.2.1 *Borrelia* spp.

Die Lyme Borreliose (LB) ist die häufigste durch Arthropoden übertragene Infektionskrankheit in Europa und Nordamerika (Piesman und Gern, 2004; Wormser et al., 2006). Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieb der schwedische Arzt Afzelius die Hauterscheinung Erythema migrans (EM) (Afzelius, 1921). Die Bezeichnung Lyme Borreliose geht auf Untersuchungen aus dem Jahr 1975 zurück, in denen Steere et al. Kinder mit Symptomen einer juvenilen rheumatoiden Arthritis und teilweise auch EM-ähnlichen Hauterscheinungen aus dem kleinen Ort Lyme in Connecticut untersuchten (Steere et al., 1977). Willy Burgdorfer gelang schließlich 1982 die Isolierung der Spirochäten (Ordnung: Spirochaetales, Familie: Spirochaetaceae) aus *Ixodes* Zecken (Burgdorfer et al., 1982). Es sind inzwischen 17 Genospezies des früheren *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes

charakterisiert (Rudenko et al., 2011). *Borrelia caporalei*, *B. kurtenbachii* und *B. finlandensis* sind als weitere Spezies vorgeschlagen (Kuzynski und Caporale, 2010; Margos et al., 2010; Casjens et al., 2011). Humanpathogenität ist bislang für *B. burgdorferi* (einzige Spezies in den USA), *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. bavariensis* (früher *B. garinii* OspA-Typ 4) gesichert. Vereinzelt gelang auch der Nachweis von *B. valaisiana*, *B. spielmanii*, *B. lusitaniae* und *B. bissettii* in Patientenmaterial (Collares-Pereira et al., 2004; Fingerle et al., 2008; Rudenko et al., 2008; Margos et al., 2009). Die LB ist eine multisystemische Erkrankung mit einer außerordentlichen Symptomvielfalt. Betroffen sind häufig Haut, Nervensystem, Bewegungsapparat und das Herz. Eine transovarielle Übertragung des Erregers tritt nur selten auf (<1%), so dass Larven vor der ersten Blutmahlzeit in der Regel nicht infiziert sind (Matuschka et al., 1992). Die Transmission der Borrelien über *co-feeding* ist selbst an Wirtstieren zu beobachten, die keine Reservoirkompetenz besitzen (Gern und Rais, 1996).

1.2.1 *Anaplasma phagocytophilum*

In den letzten Jahren gewannen durch Zecken übertragene neue Infektionskrankheiten (*emerging infectious diseases* - EID) stark an Bedeutung. Zu der Gruppe verursachender Erreger zählen u.a. *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. der Zeckenbissfieber-Gruppe, *Babesia* spp., *Coxiella burnetii* und *Francisella tularensis*. Viele Aspekte der durch EID hervorgerufenen Erkrankungen beim Menschen, einer suffizienten Diagnostik, aber auch ökologische Fragen der Reservoir-Spezifität, Wirtskompetenz und Interaktionen im Transmissionszyklus sind bisher nur unzureichend bekannt.

1994 war der Erreger der humanen granulozytären Anaplasrose (HGA, früher auch als HGE - humane granulozytäre Ehrlichiose bezeichnet) erstmals im Blut von Patienten in Minnesota und Wisconsin nachweisbar (Bakken et al., 1994; Chen et al., 1994). *Anaplasma phagocytophilum* (früher bekannt als *Ehrlichia equi* und *E. phagocytophila*) ist ein kleines (0,5-2,0 µm), pleomorphes, obligat intrazelluläres, gramnegatives Bakterium der Ordnung Rickettsiales (Familie: Anaplasmataceae). In den befallenen neutrophilen Granulozyten bilden sich intrazytoplasmatische Mikrokolonien aus, aus denen die Erreger durch Zytolyse freigesetzt werden und weitere Zielzellen befallen können (Dumler et al., 2001). In Europa sind v.a. *I. ricinus* (Parola et al., 2005a) und seltener *I. trianguliceps* Vektoren (Bown et al., 2003); in den USA ist *I. scapularis* überwiegend an der Übertragung beteiligt (Bakken und Dumler, 2000). Häufigste Manifestationen der HGA sind Unwohlsein, Fie-

ber, Myalgien und Kopfschmerzen, seltener Hautausschlag, Durchfall, Erbrechen und Atemprobleme. Die Mehrzahl der Infektionen verläuft inapparent; in 5-7% kann es aber auch zu einem schweren Verlauf mit toxischem Schock, Koagulopathie und atypischer Pneumonie kommen (Dumler et al., 2005). Anaplasmen werden nicht transovariell übertragen, so dass zur Aufrechterhaltung ihres Lebenszyklus Reservoirtiere (vermutlich Schafe, Rotwild, Kleinsäuger) erforderlich sind (Dumler et al., 2005).

1.2.3 *Rickettsia* spp.

Der amerikanische Biologe Howard Ricketts beschrieb 1909 erstmals Rickettsien als Ursache des Rocky Mountain Fleckfiebers und prägte damit den Namen des Erregers (Ricketts, 1909). Die obligat intrazellulären gramnegativen Bakterien der Ordnung Rickettsiales (Familie: Rickettsiaceae) befinden sich frei im Zytoplasma oder im Zellkern. Die Einteilung des Genus *Rickettsia* erfolgt anhand phänotypischer und serologischer Eigenschaften in die Fleckfiebergruppe (TG - *typhus group*), Zeckenbissfiebergruppe (SFG - *spotted fever group*) und die Tsutsugamushi-Fieber-Gruppe (*scrub typhus group*) (Raoult und Roux, 1997). Die SFG beinhaltet inzwischen mehr als 30 Spezies, von denen 15 als humanpathogen gelten, 16 zählen zu den *emerging pathogens* (Parola et al., 2005b). Rickettsien befallen v.a. Endothelzellen kleiner und mittlerer Blutgefäße und verursachen dadurch eine Vaskulitis, die ein klassisches Merkmal einer zeckenassoziierten Rickettsiose ist (Parola et al., 2005b). Die Erreger sind weltweit verbreitet, Hauptvektoren in Europa sind *I. ricinus*, *Dermacentor reticularis* und *D. marginatus*. In Deutschland treten mindestens 5 humanpathogene SFG-Rickettsien in Zecken auf: *R. helvetica*, *R. monacensis*, *R. felis*, *R. slovaca* und *R. massiliae* (Dobler und Wölfel, 2009). Die Bedeutung der Vertebraten als Reservoir ist noch nicht vollständig geklärt. Für einige Spezies, u.a. für *R. slovaca*, *R. africae*, *R. parkeri*, *R. sibirica*, *R. rickettsii* und *R. helvetica*, ist eine transovarielle und transstadielle Übertragung nachgewiesen (Parola et al., 2005b).

1.2.4 *Babesia* spp.

Victor Babes entdeckte Ende des 19. Jahrhunderts in Rumänien in den Erythrozyten von Rindern erstmals Mikroorganismen, die er mit Hämoglobinurie (*red water fever*) und Texasfieber (*cattle tick fever*) in Verbindung brachte (Babes, 1888). Babesien sind pleomorphe Plasmodien-ähnliche intraerythrozytäre Protozoen des Phylums Apicomplexa (Ordnung: Piroplasmida, Familie: Babesiidae). Inzwischen sind mehr als 100 Spezies in einer Vielzahl von Säugetier- und Vogelarten beschrieben (Gray und Weiss, 2008). Die

ursprüngliche Einteilung der Babesien unterschied aufgrund morphologischer Merkmale, Details im Entwicklungszyklus und der relativen Empfindlichkeit gegenüber Medikamenten kleine (z.B. *B. microti*, *B. gibsoni*) und große (z.B. *B. divergens*, *B. canis*, *B. bovis*) Arten (Gray und Pudney, 1999). Phylogenetische Analysen des 18S rRNA-Gens bestätigten diese Einteilung und ermöglichten eine Erweiterung. Vier verschiedene Gruppen von Babesien verursachen Erkrankungen beim Menschen: 1) *B. microti* und *B. microti*-like Spezies; 2) *B. duncani*; 3) *B. divergens*, *B. divergens*-like Spezies, *B. venatorum* (EU1), und 4) die in Korea beschriebene Spezies KO1 (Gray et al., 2010). Eine tödlich endende *B. divergens*-Infektion eines asplenischen Patienten aus Jugoslawien im Jahre 1956 ist der weltweit erste gut dokumentierte Fall einer humanen Babesiose (Skrabalo und Deanovic, 1957). Bislang sind mehrere Hundert weitere Fälle aus den USA und Canada dokumentiert, zumeist durch *B. microti* verursacht. In Europa gibt es dagegen nur etwa 47 berichtete Erkrankungsfälle: 43x *B. divergens*, 3x *B. divergens*-like Spezies *B. venatorum* (EU1) und 1x *B. microti* (Vannier und Krause, 2009; Gray et al., 2010, Haapasalo et al. 2010; Martinot et al., 2011). Klinische Manifestationen der humanen Babesiose reichen in Abhängigkeit vom Immunstatus des Patienten und der Babesienspezies von asymptomatischen bis lebensbedrohlichen Erkrankungen mit Herz-, Nieren- oder Leberversagen (Zintl et al., 2003). Persistierende Parasitämien treten v.a. bei *B. microti*-Infektionen auf (Krause et al., 1998, 2008). Die großen Spezies (Oberbegriff: *Babesia* sensu stricto) sind im Gegensatz zu den kleinen Babesien (z.B. *B. microti*) auch transovariell übertragbar (Uilenberg, 2006; Gray et al., 2010).

1.2.5 *Coxiella burnetii*

Coxiella burnetii ist ein gramnegatives, aerob lebendes, nur ca. 0,4 µm langes und daher fast kokkoides Stäbchen-Bakterium (Ordnung: Legionellales, Familie: Coxiellaceae). Edward Holbrook Derrick beschrieb 1937 erstmals unspezifisches Fieber bei Schlachthausarbeitern in Australien, wodurch die Erkrankung den Namen Q-Fieber (*query* - Frage) erhielt (Derrick, 1937). Q-Fieber kann klinisch sehr variabel verlaufen. Asymptomatische bis akute Manifestationen äußern sich oft in Form einer Pneumonie oder Hepatitis, während im chronischen Verlauf meist eine Endokarditis zu beobachten ist. Weide- und Haustiere sind die wichtigsten Reservoirs, aber auch Vögel, Kleinsäuger und Arthropoden weisen eine Reservoirkompetenz auf. Mehr als 40 Zeckenarten sind weltweit – mit Ausnahme von Neuseeland und der Antarktis – natürlich mit *C. burnetii* infiziert. In der Hämolymphe und in den Organen der Zecke findet eine Vermehrung statt, so dass der Zeckenkot eine hohe

Konzentration des Erregers aufweist. Es ist eine transovarielle und transstadielle Übertragung möglich; während der Zeckenpassage findet eine erhebliche Virulenzsteigerung statt (Brezina und Rehacek, 1961; Majerska und Brezina, 1968; Weyer, 1975). In Zentraleuropa ist die Schafzecke *D. marginatus* der bedeutendste Vektor (Maurin und Raoult, 1999). Der Mensch infiziert sich am häufigsten durch Inhalation kontaminierter Aerosole aus Geburtsprodukten von Paarhufern (Rinder, Schafe, Ziegen). Q-Fieber ist seit 1962 in West- bzw. seit 1979 in Ostdeutschland eine meldepflichtige Erkrankung (Hellenbrand et al., 2001). In einigen Regionen in Deutschland, z.B. in Jena (Thüringen), Göppingen (Baden-Württemberg) und Aschaffenburg (Bayern) treten einzelne Erkrankungen oder Ausbrüche regelmäßig auf (RKI, 2010).

1.2.6 *Francisella tularensis*

Francisella tularensis, der Erreger der Tularämie, ist ein sehr kleines, gramnegatives, kokkoides, sporenloses und schwer anzüchtbares Stäbchen, das den γ -Proteobakterien (Familie Pasteurellaceae) zuzuordnen ist. George McCoy beschrieb 1911 das Krankheitsbild erstmals bei einem Eichhörnchen (McCoy, 1911). Edward Francis – zu dessen Ehren der Erreger später seinen Namen erhielt – beschäftigte sich 1919 bis 1928 sehr ausführlich mit der Erkrankung und benannte sie nach dem Ort Tulare in Kalifornien/USA (Francis, 1919). *Francisella tularensis* war bislang in über 250 verschiedenen Tierarten darunter in Säugetieren, Vögeln, Fischen, Amphibien, und Arthropoden nachweisbar (Gurycova, 1998). Die entscheidenden Reservoirs sind jedoch bislang nicht eindeutig identifiziert (Mörner, 1992). Für den Menschen stellen kleine Säugetiere (v.a. Hasen), Blut saugende Ektoparasiten (z.B. Insekten der Familie Culicidae und Tabanidae, Zecken, Milben, Flöhe) sowie Wasser, Stäube und Aerosole die wahrscheinlichsten Infektionsquellen dar. Vier Subspezies sind zu unterscheiden: ssp. *tularensis* (Jellison Typ A), ssp. *holarctica* (Jellison Typ B), ssp. *mediaasiatica* und ssp. *novicida*. Klinisch bedeutsam sind in erster Linie ssp. *tularensis* und ssp. *holarctica*. Im Transmissionszyklus von ssp. *holarctica* sind in Europa v.a. die Zeckenspezies *D. nuttalli*, *D. marginatus*, *D. reticularis*, *I. ricinus* und *H. concinna* bedeutsam (Gurycova et al., 1995). Innerhalb der Zecke ist eine transovarielle und transstadielle Übertragung möglich (Hopla, 1953; Vÿrosteková, 1994). In Deutschland steigt seit 2004 die Zahl der gemeldeten Tularämie-Erkrankungen beim Menschen an (2004-2009: 64 Fälle), nachdem in einem Zeitraum von mehr als 40 Jahren zuvor nur vereinzelt Fälle auftraten (RKI, 2010).

1.3 Wirtssuchende und parasitierende *Ixodes ricinus* Zecken verschiedener Gebiete

Das Vorkommen aller erwähnten Erreger ist eng an die Verbreitung und die Aktivität ihrer Vektoren und Reservoirre gebunden. Bislang fehlen detaillierte und systematische Untersuchungen über das Vorkommen v.a. der *emerging pathogens* und ihrer potentiellen Reservoirtiere.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Erweiterung der Kenntnisse zur Bedeutung des Vektors *I. ricinus* und verschiedener Wirte im Transmissionszyklus zeckenassoziierter Pathogene. Wir untersuchten dazu Freilandzecken sowie an 17 Vogel- und 2 Kleinsäugerarten parasitierende Zecken aus 4 verschiedenen Fanggebieten in Deutschland mit Hilfe molekularbiologischer Methoden und phylogenetischer Analysen auf die Prävalenz und Koexistenz eines breiten Erregerspektrums (Abb. 2).

Die im Ilmtal (Thüringen) gelegenen Fangflächen (Belvedere nahe Weimar, Bad Berka, Dienststedt) haben eine Fläche von ca. 8 ha. Bad Berka und Dienststedt sind jeweils an Waldrändern gelegen, während das Fanggebiet in Belvedere aus dem Randbereich eines Parkes mit Buschvegetation und Übergang zu einem Buchenwald besteht.

Der Zeitgrund ist ein Naherholungsgebiet zwischen Hermsdorf und Stadtroda in Thüringen. Die Fangfläche ist etwa 7 ha groß und besteht aus Unterholz, Laub- und Mischwald mit Wiesen entlang des Zeitbaches und des Hauptwanderweges, der sehr häufig von Wanderern, Joggern oder Radfahrern genutzt wird.

Die zur Gemeinde Kleinbartloff gehörende Untersuchungsfläche Reifenstein liegt im Eichsfeld in Nordthüringen. Das Hauptfanggebiet hat eine Größe von ca. 15 ha und schließt einen Buchenmischwald, einen Auenwaldrest in Form einer Feuchtwiese, sowie Ackerflächen ein. Eine zweite ca. 8 ha große Fangfläche umfasst einen Teich, ein Feuchtbio-top mit Schilf- und Sauergrasbewuchs, eine gut ausgebildete Kraut- und Strauchschicht sowie einige Laubbäume.

Die Greifswalder Oie ist eine ca. 54 ha große Vogelschutzinsel in der Pommerschen Bucht, 12 km nördlich von Usedom. Der öffentliche Zugang zu diesem vom Verein Jordsand e.V. verwalteten Gebiet ist streng limitiert. Laubwaldbereiche, halb offene Weideflächen und ausgedehnte Strauchflächen prägen die Landschaft. Viele Zugvogelarten nutzen die Insel als wichtiges Rastgebiet; die Diversität der Säugetierarten ist hingegen auf Schafe und Siebenschläfer (*Glis glis*) beschränkt.

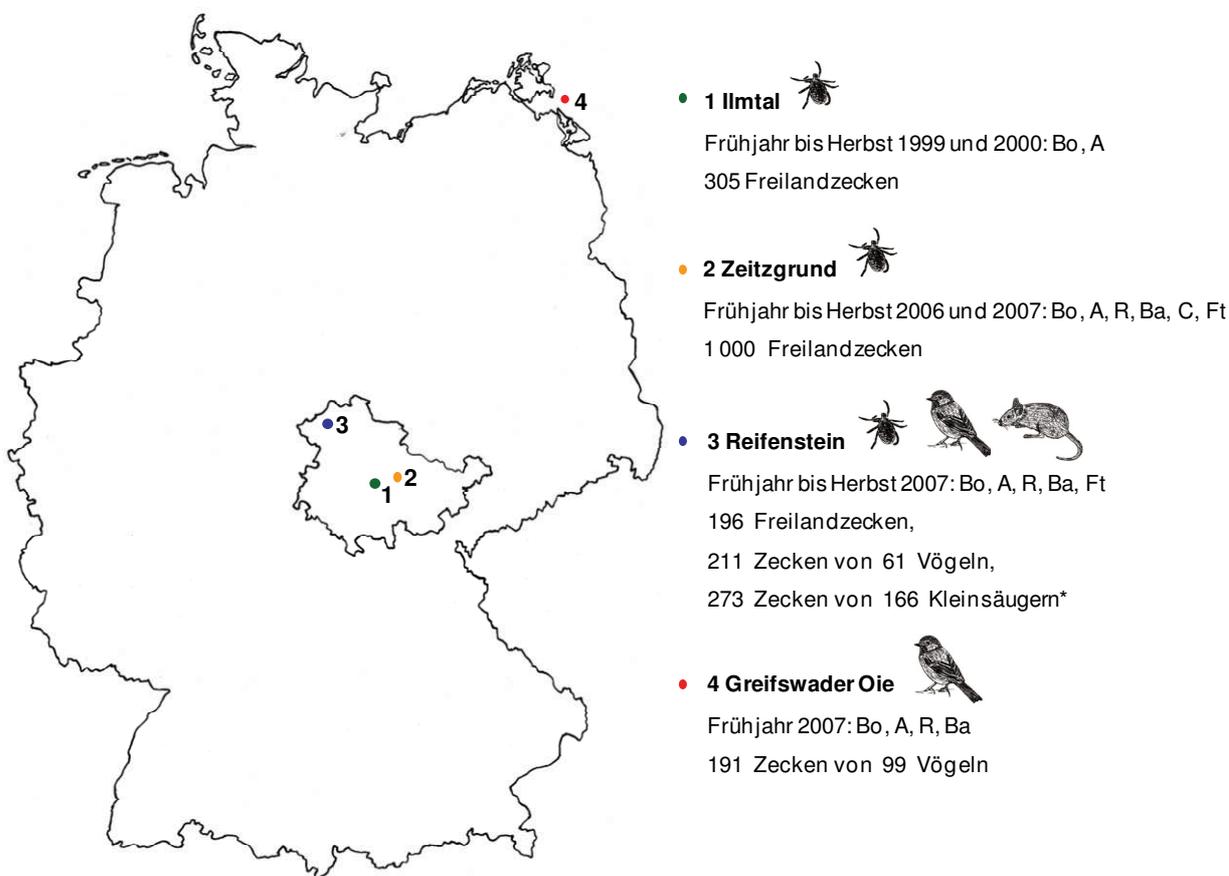


Abb. 2: Lage der Untersuchungsgebiete

Vogelarten: Amsel (*Turdus merula*), Blaumeise^R (*Cyanistes caeruleus*), Buchfink^G (*Fringilla coelebs*), Dorngrasmücke^G (*Sylvia communis*), Gartenrotschwanz^G (*Phoenicurus phoenicurus*), Gimpel^R (*Pyrrhula pyrrhula*), Heckenbraunelle^R (*Prunella modularis*), Kohlmeise (*Parus major*), Mönchsgrasmücke^R (*Sylvia atricapilla*), Rotdrossel^G (*Turdus iliacus*), Rotkehlchen (*Erithacus rubecula*), Singdrossel (*Turdus philomelos*), Sprosser^G (*Luscinia luscinia*), Sumpfrohrsänger (*Acrocephalus palustris*), Teichrohrsänger^R (*Acrocephalus scirpaceus*), Zaunkönig (*Troglodytes troglodytes*), Zilpzalp^R (*Phylloscopus collybita*)

^G-Arten stammen nur von der Greifswalder Oie, ^R-Arten stammen nur aus Reifenstein

Kleinsäugerarten: Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*), Rötelmaus (*Myodes glareolus*)

* Zusätzlich untersuchten wir das Serum der Kleinsäuger im Immunfluoreszenztest (IFT) auf Borrelien und Ohrbiopate in der PCR auf *Borrelia* spp., *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp.

Zeckenassoziierte Erreger: Bo - *Borrelia* spp.; A - *Anaplasma phagocytophilum*; R - *Rickettsia* spp.; Ba - *Babesia* spp.; C - *Coxiella burnetii*; Ft - *Francisella tularensis*

Anmerkung: In Reifenstein standen aufgrund einer begrenzten DNA-Menge je nach Erreger und Herkunft der Zecken 1-22 Proben weniger zur Verfügung.

Freilandzecken stammten aus den Gebieten Ilmtal, Zeitzgrund und Reifenstein. Die Flaggmethode (*flagging*) ermöglichte das Sammeln ungesogener wirtssuchender Nymphen und adulter Zecken. Vogelassoziierte Zecken bekamen wir im Rahmen routinemäßiger Beringungsarbeiten von Ornithologen aus Reifenstein und der Greifswalder Oie für unsere Arbeit zur Verfügung gestellt. Ein Foto eines mit Zecken infestierten Rotkehlchens ist in Abb. 3 zu sehen. Die kleinsäugerassoziierten Zecken aus Reifenstein sammelten wir mit beköderten Lebendfallen. Für serologische und weitere molekularbiologische Untersuchungen gewannen wir von den Kleinsäufern zusätzlich 300 - 500 µl Blut aus dem Plexus retrobulbaris und ein kreisrundes Ohrbiopat ($\varnothing=4$ mm). Bei intervallskalierten Werten (z.B. Infestationsraten, Antikörpertiter) kam für den Vergleich zweier Mittelwerte unabhängiger Stichproben ein unverbundener t-Test auf einer Signifikanzebene von $\alpha=0,05$ zur Anwendung. Als signifikant verschieden galt die errechnete Wahrscheinlichkeit von $p<0,05$. Erregerprävalenzen verglichen wir je nach Größe der Stichprobenanzahl mit dem Chi-Quadrat Test (χ^2 -Test) nach Pearson oder mit dem exakten Test nach Fisher. Auch für diese Tests galt ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$.



Abb. 3: Zeckenentnahme bei einem Rotkehlchen

(Foto: Dr. A. Goedecke, ProRing e.V.)

2. Prävalenz und Heterogenität von *Borrelia* spp.

Dieser Abschnitt bezieht sich auf folgende Originalarbeiten:

Hildebrandt A, Schmidt KH, Wilske B, Dorn W, Straube E, Fingerle V. 2003. Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and coinfection with *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes ricinus* ticks in Central Germany (Thuringia). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 22:364-367. (OA2)

Hildebrandt A, Pauliks K, Sachse S, Straube E. 2010a. Coexistence of *Borrelia* spp. and *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 10:831-837. (OA5)

Franke J, Fritsch J, Tomaso H, Straube E, Dorn W, Hildebrandt A. 2010a. Co-existence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat of Central Germany. *Appl Environ Microbiol*, 76:6829-6836. (OA11)

Franke J, Moldenhauer A, Hildebrandt A, Dorn W. 2010b. Are birds reservoir hosts for *Borrelia afzelii*? *Ticks Tick-borne Dis*, 1:109-112. (OA12)

In Europa gibt es in vielen Ländern nur Schätzungen zur LB-Inzidenz. Die höchste Inzidenz ist in Zentraleuropa (z.B. Slowenien: 155/100 000 Einwohner) zu finden, die niedrigsten Inzidenzen sind in Großbritannien (0,7/100 000 Einwohner) und Irland (0,6/100 000 Einwohner) dokumentiert (Stanek et al., 2011). In Deutschland beschäftigt sich das GILEAD-Projekt (*German investigation on Lyme Borreliosis: evaluation of therapeutic and diagnostic cost*) erstmals mit der Charakterisierung der Krankheitslast und der medizinischen Kosten der Erkrankung. Eine Krankenversicherung mit 6,6 Millionen Mitgliedern stellte Daten ambulanter und stationärer Patienten zur Verfügung, anhand derer eine Auswertung medizinischer, epidemiologischer und ökonomischer Aspekte (ICD- und EBM-Kodierung) der Diagnostik und Therapie der LB möglich sind. Vorläufige Betrachtungen ergaben einen erstmaligen Diagnosecode der LB im Jahr 2007 für 23 310 der 6,6 Millionen Versicherten. Gleichzeitig waren 762 Patienten mit vermuteter oder gesicherter LB in stationärer Behandlung. Die Anzahl angeforderter serologischer Tests betrug 29 616 ELISAs und 16 832 Immunoblots im stationären Bereich. Ambulante Kostenabrechnungen zeigten 203 871 durchgeführte ELISAs und 58 737 Immunoblots auf. Im untersuchten Zeitraum erhielten 35 665 Patienten aufgrund der Indikation LB eine antibiotische Therapie. Diese Daten lassen sich weiter auf die Gesamtbevölkerung in Deutschland hochrechnen. Dabei entsteht der Eindruck, dass ein erhebliches Mißverhältnis von tatsächlichen Erkrankungen und durchgeführten diagnostischen Tests bzw. antibiotischen Behandlungen besteht (Freitag et al., 2010). Weitere Datenauswertungen dieser Art sind jedoch für eine umfangreiche ökonomische Beurteilung der aktuellen und zukünftigen Diagnostik und Therapie der LB erforderlich.

Die Assoziation verschiedener Spezies mit bestimmten Reserviertieren beruht vermutlich auf der Sensitivität gegen das Komplementsystem des Wirtes (Kurtenbach et al., 1998a, 2002a). Folgende Erreger-Reservoir-Beziehungen sind für die einzelnen Borrelienspezies beschrieben:

- *B. valaisiana*, *B. garinii* - Vögel (Hanincová et al., 2003a; Taragel'ová et al., 2008);
- *B. afzelii*, *B. bavariensis* - Kleinsäuger (Hanincová et al., 2003b; Hu et al., 2001);
- *B. burgdorferi* - Vögel und Kleinsäuger (Wright et al., 2000);
- *B. lusitaniae* - Eidechsen (Majathová et al., 2006; Richter und Matuschka, 2006);
- *B. spielmanii* - Bilche (Gliridae) und Igel (Gern, 2009).

Neue Untersuchungsmethoden der Molekularbiologie ermöglichen eine differenziertere Betrachtung darüber, inwieweit einzelne Spezies mit bestimmten klinischen Manifestationen der LB assoziiert sind. Die Zusammenhänge sind allerdings weniger absolut als zunächst angenommen. In Europa dominiert *B. afzelii* in Hauterscheinungen (Wilske et al., 1996a; Ohlenbusch et al., 1996) und *Borrelia garinii* (v.a. OspA-Typ 4, jetzt *B. bavariensis*) ist häufiger mit der Klinik der Neuroborreliose assoziiert (Eiffert et al., 1995; Wilske et al., 1996b). *Borrelia burgdorferi* hingegen ist die einzige Spezies der LB in den USA, die häufig bei der Lyme-Arthritis nachweisbar ist. In Europa waren zusätzlich *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. spielmanii* in Synovialflüssigkeit des Menschen zu finden (Eiffert et al., 1995; Wilske et al., 1996b; Ornstein et al., 2010).

Eine Genospeziesdifferenzierung ist anhand einer Vielzahl plasmidkodierter Gene, wie z.B. der für die Oberflächenproteine A und C kodierenden Gene *ospA* und *ospC* möglich (Wang et al., 1999; Lenčáková et al., 2006). Die Analyse bestimmter *housekeeping* Gene und der 5S-23S *intergenic spacer* Region sind weitere sehr hilfreiche Methoden zur Charakterisierung der LB-Borrelien auf phylogenetischer Ebene (Margos et al., 2008, 2009). Das Wissen über die Ökologie und Epidemiologie verschiedener Spezies und OspA-Typen ist eine essentielle Voraussetzung für das Verständnis der Zirkulation der Erreger, die Weiterentwicklung diagnostischer Tests und die Entwicklung einer Impfung (Gern et al., 1997; Schuijt et al., 2011). Das *ospA*-Gen diente auch in der vorliegenden Arbeit als PCR-Target. Die Restriktionsanalyse ermöglichte es, ein breites Spektrum an Spezies zu differenzieren und Mischinfektionen verschiedener Borrelienspezies zu erfassen (Tab. 1).

Ref.- Stamm	Geno- spezies	OspA- Typ	RFLP Muster (bp)					
			Restriktionsenzyme					
			<i>Kpn2I</i>	<i>BglII</i>	<i>SfuI</i>	<i>SspI</i>	<i>HindIII</i>	<i>XbaI</i>
PKa2	bur	1	798	798	798	534/264	654/144	n
CA8	bur	1	429/369	798	798	534/264	654/144	n
PKo	afz	2	798	798	537/261	798	798	n
PBr	gar	3	429/372	758/43	801	801	801	n
PBi	bav	4	798	556/242	798	798	798	n
PHei	gar	5	549/195/54	798	798	798	654/144	745/53
TN	gar	6	429/252/120	801	801	801	657/144	606/122/73
PRef	gar	7	428/372	758/43	801	801	657/144	n
PKi	gar	8	801	801	801	801	585/144/72	725/76
VS116	val I	-	801	801	801	801	465/336	798
NE231	val II	-	798	665/133	798	798	665/133	556/242
PotiB2	lus	-	807	807	807	466/341	402/284/72/49	n
A14S	spiel	-	798	665/133	798	798	665/133	798

Tab. 1: Charakterisierung der Borrelien-Genospezies und OspA-Typen

Erweiterte und modifizierte RFLP-Analyse nach Michel et al. (2003) und Lenčáková et al. (2006).

Borrelien-Genospezies: n - nicht getestet; bur - *B. burgdorferi*; afz - *B. afzelii*; gar - *B. garinii*; bav - *B. bavariensis* (ehemals *B. garinii* OspA-Typ 4); val I und II - *B. valaisiana* Subtyp I und II; lus - *B. lusitaniae*; spiel - *B. spielmanii*

Accession-Nummern der Referenzstämme:

B. burgdorferi PKa: X80182, *B. burgdorferi* CA8: L23144, *B. afzelii* PKo: S48322, *B. garinii* PBr: X80256, *B. bavariensis* (ehemals *B. garinii*) PBi: S48323, *B. garinii* PHei: X80251, *B. garinii* TN: X80252, *B. garinii* PRef: X95362, *B. garinii* PKi: X97236, *B. valaisiana* VS116 AF095940, *B. valaisiana* NE231: AJ249467, *B. lusitaniae* PotiB2: Y10838, *B. spielmanii* A14S: AF102057

Wirtssuchende Zecken

In europäischen Untersuchungen von Freilandzecken sind Larven bis 11%, Nymphen bis 43% und adulte Zecken bis 58% mit *Borrelia* spp. infiziert (Hubálek und Halouzka, 1998; Rauter und Hartung, 2005). *Borrelia garinii* und *B. afzelii* sind die zumeist vorherrschenden Spezies. *Borrelia burgdorferi* und *B. valaisiana* treten weniger häufig auf und *B. lusitaniae* ist nur selten nachweisbar. Das Vorkommen der einzelnen Spezies ist sowohl zwischen verschiedenen Ländern Europas als auch zwischen benachbarten Untersuchungsgebieten sehr heterogen (Hubálek und Halouzka, 1998; Kurtenbach et al., 2001; Jouda et al., 2003; Michel et al., 2003; Rauter und Hartung, 2005; Casati et al., 2006; Lenčáková et al., 2006; Fingerle et al., 2008; Cekanac et al., 2010; Halos et al., 2010; Reye et al., 2010). In Deutschland beträgt die Infektionsrate in Zecken bis zu 28,7%, wobei Schwankungen je nach Untersuchungs-jahr und Untersuchungsgebiet auftreten (Kipp, 2008; Fingerle et al., 2008; Franke, 2010).

In unserer Studie fanden wir in den Freilandzecken in Thüringen eine Infektionsrate von 5,1% (10/196) in Reifenstein (Franke et al., 2010a), 11,1% (34/305) im Ilmtal (Hildebrandt et al., 2003) und 27,0% (270/1000) im Zeitzgrund (Hildebrandt et al., 2010a). Im Ilmtal erfolgte der Restriktionsverdau der positiven Amplifikate im Gegensatz zur Darstellung in Tabelle 1 mit den Enzymen *Kpn2I*, *BglIII*, *SfuI*, *SspI* und *AlwNI*, so dass wir in diesem Gebiet nur folgende Spezies identifizieren konnten: *B. burgdorferi*, *B. afzelii*, *B. garinii* OspA-Typ 3, 5, und 6/8, *B. bavariensis* (zu diesem Zeitpunkt noch *B. garinii* OspA-Typ 4) und *B. valaisiana*. Im Zeitzgrund und in Reifenstein ermöglichte das erweiterte RFLP-Verfahren der Tabelle 1 die Charakterisierung eines breiteren Spektrums an Genospezies. So fanden wir im Zeitzgrund: *B. burgdorferi*, *B. afzelii*, *B. garinii* OspA-Typ 3, 5, 6, 7 und 8, *B. bavariensis*, *B. valaisiana* Subtyp I und II, *B. spielmanii* und *B. lusitaniae* und in Reifenstein: *B. burgdorferi* und *B. garinii* OspA-Typ 6, *B. bavariensis* und *B. valaisiana* Subtyp I. Im Ilmtal und im Zeitzgrund waren signifikant mehr Adulte (Ilmtal: 21,0%, Zeitzgrund: 32,3%) als Nymphen (Ilmtal: 8,6%, $p=0,021$; Zeitzgrund: 20%, $p=0,01$) infiziert. In beiden Gebieten dominierte *B. garinii*, gefolgt von *B. burgdorferi* und *B. afzelii*. Interessanterweise war *B. burgdorferi* in Reifenstein und in einer weiteren Studie aus Thüringen sogar die am häufigsten nachgewiesene Spezies in Freilandzecken (Kipp, 2008). Der hohe Anteil an *B. burgdorferi* steht somit im Kontrast zu anderen Untersuchungen, in denen diese Spezies selten zu finden war (Rauter und Hartung, 2005; Fingerle et al., 2008). Ein Grund dafür kann die Vielfalt an Wirten in den jeweiligen Gebieten sein, die *B. burgdorferi* beim Saugen auf *I. ricinus* übertragen können.

Nur wenige Studien berichten über saisonale Unterschiede der Borrelienprävalenz in Zecken mit oftmals bimodalem Infektionsmuster (Kipp, 2008; Reye et al., 2010). Wir fanden jeweils einen unimodalen Verlauf der Infektionen mit einem Peak im Juli/August 1999/2000 (Ilmtal) sowie Juli 2006 und Juni 2007 (Zeitzgrund) (Abb. 5, Seite 23). Das Spektrum an Borrelienspezies ist in Europa einer hohen lokalen Variabilität unterworfen (Rauter und Hartung, 2005). Bislang gibt es allerdings keine systematischen Untersuchungen dazu, wie stabil diese Verteilung der Genospezies über einen längeren Zeitraum in einer Region ist. Unsere Ergebnisse in Freilandzecken zeigen eine besonders große Vielfalt an Borrelien-Genospezies und OspA-Typen (Abb. 4, Seite 18). Aktuelle ELISAs in Europa beinhalten oftmals Gemische aus nativen Borrelien-Antigenen und rekombinant hergestelltem VlsE bzw. ein synthetisches Peptid (C6 - 26 Aminosäuren, hochkonservierter Bereich des VlsE) der Spezies *B. burgdorferi*, *B. afzelii* und *B. garinii*. In den zur Bestätigung eines

positiven ELISA eingesetzten Immunoblots sind je nach Hersteller verschiedene Antigene der Borrelien-Genospezies *B. burgdorferi*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis* und *B. spielmanii* enthalten (z.B. www.virotech.de; www.mikrogen.de). Die große in unseren Untersuchungen dargestellte lokale Heterogenität der Borrelien erfordert neben einer systematischen Untersuchung von Freilandzecken verschiedener Regionen in Europa auch ein unabhängiges System zur Evaluierung und ggf. Anpassung serologischer Tests an die lokal zirkulierenden Genospezies und OspA-Typen.

Vogelassozierte Zecken

Bodenbewohnende Vogelarten weisen generell eine hohe Infestationsrate auf. Sie sind häufig mit Borrelien-infizierten Zecken infestiert (Comstedt et al., 2006; Špitalskà et al., 2006). Comstedt et al. (2006) beschreiben eine Prävalenz von 1,4% Borrelien in gesogenen vogelassozierten Zecken aus Schweden; in Westpolen sind es sogar 27,4% (Dubska et al., 2009).

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Ernährungswissenschaften in Jena (Franke, 2010) untersuchten wir insgesamt 17 verschiedene, ausschließlich oder teilweise bodenlebende Vogelarten der Ordnung Passeriformes aus 2 Untersuchungsgebieten in Deutschland (Abb. 2, Seite 9), die bis auf die Kohlmeise (*Parus major*) als Zugvögel oder Teilzieher gelten (Franke et al., 2010a, b). Unter Teilziehern versteht man Vögel, deren Population im Winter teilweise in den Süden zieht, teilweise jedoch in ihrem Brutgebiet verbleibt bzw. nur unwesentlich ihre Heimat wechselt. Die mittlere Infestation der 160 untersuchten Vögel lag bei 2,5 Zecken pro Vogel. Die höchsten Infestationsraten wiesen Amseln (*Turdus merula*), Rotdrosseln (*Turdus iliacus*), Rotkehlchen (*Erithacus rubecula*) und Singdrosseln (*Turdus philomelos*) auf. Dieses steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen (Olsen et al. 1995a; Hanincová et al., 2003a; Comstedt et al., 2006; Kipp et al., 2006; Kipp, 2008; Dubska et al., 2009).

In insgesamt 14,7% (59/402) der an Vögeln parasitierenden Zecken gelang uns der Nachweis Borrelien-spezifischer DNA. Die Prävalenz in parasitierenden Larven (20,2%) war signifikant höher als in Nymphen (12,2%, $p=0,026$), was die Vermutung der Reservoirkompetenz der untersuchten Vogelarten bekräftigt. Am häufigsten fanden wir *B. garinii* OspA-Typ 6, seltener die Genotypen *B. burgdorferi*, *B. valaisiana* Subtyp I und II, *B. garinii* OspA-Typen 3, 5 und 7. Interessant war der erstmalige Nachweis der kleinsäugerassozierten Spezies *B. bavariensis* und der hohe Anteil der ebenfalls mit

Kleinsäugetern in Verbindung stehenden Spezies *B. afzelii* (Abb. 4, Seite 18). Die 6 *B. afzelii*-positiven Nymphen können bereits vor der Blutmahlzeit infiziert gewesen sein, da sie im Larvenstadium bereits an einem anderen Wirt gesaugt hatten (Abb. 1, Seite 2). Bei den 7 *B. afzelii*-infizierten Larven ist hingegen davon auszugehen, dass die Vögel diese Genospezies während der Blutmahlzeit auf die Zecken übertragen haben: die Larven saugten zum ersten Mal und die transovariable Übertragungsrate von Borrelien beträgt weniger als 1% (Matuschka et al., 1992). Die positiven Larven fanden sich jeweils isoliert an den Vögeln, so dass die Transmission der Borrelien auf die Larven über *co-feeding* als unwahrscheinlich erscheint, wenngleich die Möglichkeit des prolongierten *co-feeding* nicht sicher auszuschließen ist.

Der Großteil der *B. afzelii*-infizierten Zecken, die wir an Vögeln fanden, stammte von der Greifswalder Oie, einer Insel mit außergewöhnlichen Lebensbedingungen für *I. ricinus*, v.a. wegen der geringen Abundanz und Diversität von Säugetierwirten. *Borrelia afzelii* war in niedrigerer Prävalenz auch in anderen Untersuchungen in vogelassozierten Zecken nachweisbar (Comstedt et al., 2006; Kipp et al., 2006; Taragel'ová et al., 2008), darunter auch in Larven (Olsen et al., 1995b; Poupon et al., 2006; Dubska et al., 2009).

Amseln scheinen eine besonders hohe Reservoirkompetenz für Borrelien zu besitzen, denn 40% der untersuchten Tiere trugen Borrelien-infizierte Zecken. Das Spektrum an Genospezies und OspA-Typen war im Vergleich zu kleinsäugerassozierten Zecken sehr breit (Abb. 4, Seite 18). Frühere Studien zeigen allerdings, dass dieses Spektrum selbst innerhalb der Untersuchungsgebiete stark schwankt (Kipp et al., 2006; Stern et al., 2006; Kipp, 2008). Die strenge Assoziation der Borrelien-Genospezies mit einem bestimmten Wirtorganismus lies sich nicht bestätigen: wir fanden z.B. die kleinsäugerassozierten Genospezies *B. afzelii* und *B. bavariensis* in Zecken, die an Vögeln parasitierten. Die positiven Larven lassen unter Berücksichtigung der geringen Wahrscheinlichkeit einer transovariable Übertragung der Borrelien und des *co-feeding* eine Reservoirkompetenz der Vögel für diese Spezies vermuten.

Kleinsäugerassozierte Zecken

Die Literatur liefert sehr unterschiedliche Angaben zur Borrelien-Prävalenz in kleinsäugerassozierten Zecken. Ältere Studien, in denen der Nachweis mittels Immunfluoreszenztest (IFT) erfolgte, berichten über relative hohe Infektionsraten von 13% in gesogenen Larven und bis 50,0% in Nymphen und adulten Zecken (Humair et al., 1993; Michalik et

al., 2003). In serologischen Methoden können allerdings durch kreuzreagierende Antikörper anderer Spirochäten (Treponemen, Leptospiren, Rückfallfieber-Borrelien) falsch positive Ergebnisse entstehen (Hummler, 2001; Štefančíková et al., 2008). In molekularbiologischen Untersuchungen sind im Vergleich zum IFT geringere Infektionsraten von 3% bis 5,7% in gesogenen, an Mäusen parasitierenden *I. ricinus* Zecken nachweisbar (Franke, 2005; Siński et al., 2006a).

In unserem Fanggebiet in Reifenstein, in dem wir eng mit dem Institut für Ernährungswissenschaften in Jena zusammenarbeiteten (Franke, 2010; Franke et al., 2010a), war die mittlere Infestationsrate von Gelbhalsmäusen (*Apodemus flavicollis*: 3,5) signifikant höher als von Rötelmäusen (*Myodes glareolus*: 2,5). Wir fanden eine sehr geringe Borrelienprävalenz in kleinsäugerassoziierten Zecken: nur 2,6% (7/273) der untersuchten Zecken an 6 Tieren (2 Gelbhalsmäuse, 4 Rötelmäuse) waren positiv. In der Speziesdifferenzierung zeigten sich lediglich die beiden Spezies *B. afzelii* und *B. burgdorferi* (Abb. 4, Seite 18), von denen bekannt ist, dass sie von Kleinsäufern auf Zecken übertragen werden (Kurtenbach et al., 1998b; Hanincová et al., 2003b).

Zusätzlich waren im Blut der Kleinsäuger mit dem IFT in 28,3% der Gelbhalsmäuse bzw. 27,8% der Rötelmäuse IgG-Antikörper nachweisbar. Saisonal zeichnete sich ein signifikanter Anstieg der Seroprävalenz vom Frühjahr (15,0%) zum Sommer (42,9%, $p < 0,0001$) ab. Im Herbst sank sie nur leicht auf 37,5% (Franke, 2010). Ein Erklärungsansatz für die geringe Seroprävalenz im Frühjahr ist die höhere Mortalität infektiöser Mäuse in den Wintermonaten. Im darauf folgenden Frühjahr ist somit die Anzahl seropositiver Tiere im Verhältnis zu seronegativen kleiner und steigt im Jahresverlauf wieder an (Tälleklint und Jaenson, 1995). Von den 6 Tieren, die Borrelien infizierte Zecken trugen, hatten nur 2 einen erhöhten Antikörpertiter.

Pawelczyk und Siński (2000) beschrieben bereits die fehlende Korrelation der Antikörpertiter mit der Infestationsrate Borrelien-infizierter Zecken. Da die Infektiosität der Wirtstiere negativ mit der Stärke ihrer Immunantwort korreliert (Kurtenbach et al., 1994, 2002a, b), lassen die Seroprävalenz und die Höhe der Antikörpertiter keine Rückschlüsse auf die Reservoirkompetenz der Kleinsäuger zu. Die Ergebnisse xenodiagnostischer Tests zeigen eindeutig, dass Kleinsäuger Borrelien auf Zecken übertragen können. Die Reservoirkompetenz scheint allerdings geringer zu sein als bisher vermutet, denn bei allen früheren xenodiagnostischen Studien war der IFT mit dem bereits erwähnten Problem der Kreuzreaktivitäten die Nachweismethode der Wahl (Humair et al. 1993; Gern et al., 1994). Eine

xenodiagnostische Analyse mittels PCR konnte nur in 1,3% der an Kleinsäugetern gesogenen, vorher nüchternen Larven eine Transmission der Borrelien nachweisen, wobei 19% der eingesetzten Tiere eine in Hirn- und Nierengewebe bestätigte Borrelieninfektion aufwiesen (Kurtenbach et al., 1998b). Für das Verständnis der Zirkulation einzelner Spezies in reservoirkompetenten Wirtsorganismen sind weitere Transmissionsexperimente unter Verwendung molekularbiologischer Methoden erforderlich.

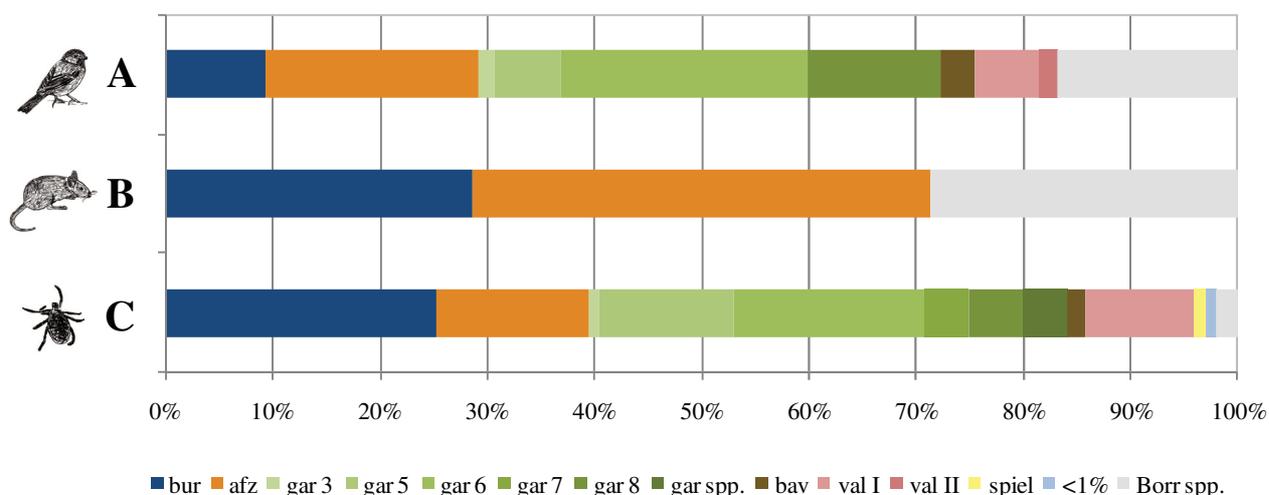


Abb. 4: Spektrum der Borrelien-Genospezies und OspA-Typen in wirtssuchenden und parasitierenden *I. ricinus* Zecken

Herkunft der Zecken: A - vogelassozierte Zecken der Gebiete Greifswalder Oie und Reifenstein (Borrelien: 59/402)

B - kleinsäugerassozierte Zecken des Gebietes Reifenstein (Borrelien: 7/273)

C - Freilandzecken der Gebiete Zeitzgrund (Borrelien: 270/1000) und Reifenstein (Borrelien: 10/196)

Borrelien-Genospezies und OspA-Typen:

bur - *B. burgdorferi*; afz - *B. afzelii*; gar 3, 5, 6, 7, und 8 - *B. garinii* OspA-Typ 3, 5, 6, 7 und 8; gar spp. - nicht näher charakterisierte Spezies *B. garinii*; bav - *B. bavariensis* (früher *B. garinii* OspA-Typ 4); val I und II - *B. valaisiana* Subtyp I und II; spiel - *B. spielmanii*; Borr spp. - nicht näher charakterisierte *Borrelia* Spezies; <1% - 2 Freilandzecken waren mit *B. valaisiana* Subtyp II infiziert und in einer Freilandzecke gelang der Nachweis von *B. lusitaniae*.

Die dieser Abbildung zugrunde liegenden Daten sind den Publikationen Hildebrandt et al, 2003, 2010a; Franke et al., 2010a, b entnommen.

3. Prävalenz verschiedener *emerging pathogens*

Dieser Abschnitt bezieht sich auf folgende Originalarbeiten:

Hildebrandt A, Schmidt KH, Fingerle V, Wilske B, Straube E. 2002. Prevalence of granulocytic *Ehrlichiae* in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany (Thuringia) detected by PCR and sequencing of a 16S ribosomal DNA fragment. *FEMS Microbiology Letters*, 211:225-230. (OA1)

Hildebrandt A, Hunfeld KP, Baier M, Krumbholz A, Sachse S, Lorenzen T, Kiehntopf M, Fricke HJ, Straube E. 2007. First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 26:595-601. (OA3)

Hildebrandt A, Tenter AM, Straube E, Hunfeld KP. 2008. Human Babesiosis in Germany: Just overlooked or truly new? *Int J Med Microbiol*, 298 (Suppl 1):336-346. (OA4)

Hildebrandt A, Pauliks K, Sachse S, Straube E. 2010a. Coexistence of *Borrelia* spp. and *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 10:831-837. (OA5)

Hildebrandt A, Krämer A, Sachse S, Straube E. 2010b. Detection of *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia). *Ticks Tick-borne Dis*, 1:52-56. (OA6)

Hildebrandt A, Franke J, Meier F, Sachse S, Dorn W, Straube E. 2010c. The role of migratory birds in transmission cycles of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. *Ticks Tick-borne Dis*, 1:105-107. (OA7)

Hildebrandt A, Fritsch J, Franke J, Sachse S, Dorn W, Straube E. 2011a. Co-circulation of emerging tick-borne pathogens in Middle Germany. 2010 *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11:533-537. (OA8)

Hildebrandt A, Straube E, Neubauer H, Schmoock G. 2011b. *Coxiella burnetii* in *Ixodes ricinus* ticks, Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11:1205-1207. (OA9)

Franke J, Fritsch J, Tomaso H, Straube E, Dorn W, Hildebrandt A. 2010a. Co-existence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat of Central Germany. *Appl Environ Microbiol*, 76:6829-6836. (OA11)

Franke J, Meier F, Moldenhauer A, Straube E, Dorn W, Hildebrandt A. 2010c. Established and emerging pathogens in *Ixodes ricinus* ticks collected from birds on a conservation island in the Baltic Sea. *Med Vet Entomol*, 24:425-432. (OA13)

3.1 *Anaplasma phagocytophilum*

Anaplasmen haben ein sehr breites Spektrum potentieller Reservoiertiere, u.a. Schafe, Reh- und Rotwild, sowie Kleinsäuger (Liz et al., 2000, 2002; de la Fuente et al., 2008, Ladbury et al., 2008). Die Infektionsdauer der Kleinsäuger ist in der Regel nur kurz und die Erreger persistieren zumeist nicht im Winter (Beugnet und Marie, 2009). Die Rolle von Vögeln im Transmissionszyklus der Anaplasmen ist bislang unklar, sie haben allerdings eine Bedeutung in der Verbreitung der Erreger (Alekseev et al., 2001; Bjoersdorff et al., 2001; Skotarczak et al. 2006; Ioannou et al. 2009).

Häufig verwendete Gene zum Nachweis von *A. phagocytophilum* sind das 16S rRNA-Gen, das Zitratsynthase-Gen (*gltA*), das *groESL*-Operon, welches die beiden Hitzeschockproteingene *groEL* und *groES* kodiert, das Ankyrin *repeat*-Gen (*ank*) und die *major surface protein*-Multigenfamilie (*p44/msp2*, *msp4*) (Sumner et al., 1997; Chae et al., 2000; Caturegli et al., 2000; Inokuma et al., 2001; Casey et al., 2004). In unseren Untersuchun-

gen amplifizierten wir einen 944 bp großen Abschnitt des 16S rRNA-Gens. Die Bestätigung positiver Amplifikate erfolgte in einem Restriktionsverdau mit dem Enzym *SspI* bzw. in der Sequenzierung (Hildebrandt et al., 2002; 2010b, c; 2011a).

Wirtssuchende Zecken

Inzwischen existieren aus fast allen europäischen Ländern Nachweise von *A. phagocytophilum* in Freilandzecken, die eine Prävalenz von 1,9% in Luxemburg (Reye et al., 2010) bis hin zu 23,6% in Dänemark (Skarphedinsson et al. 2007) erreichen. Studien in Deutschland berichten von 1% - 2,9% infizierten Zecken in Süddeutschland (Fingerle et al., 1999; Hartelt et al., 2004; Silaghi et al., 2008a) und 3,9% in Berlin (Pichon et al., 2006).

In den ausgewählten Untersuchungsgebieten in Thüringen fanden wir *A. phagocytophilum* in 2,3% (7/305) der Zecken im Ilmtal (Hildebrandt et al., 2002) und 5,4% der Zecken (54/1000) im Zeitzgrund (Hildebrandt et al., 2010b). Es waren mehr Adulte (5,7%) als Nymphen (2,8%) infiziert. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p > 0,05$), steht allerdings im Einklang mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen (Derdakova et al., 2003; Skarphedinsson et al., 2007). Lediglich eine Studie aus Norwegen ergab einen signifikant häufigeren Nachweis von *Anaplasma* spp. in Nymphen (Jenkins et al., 2001). Dies lässt verschiedene enzootische Zyklen von *A. phagocytophilum* in Reserviertieren unterschiedlicher Regionen vermuten. Wir beobachteten ähnlich den Ergebnissen anderer Arbeiten (Skarphedinsson et al., 2007; Wojcik-Fatla et al., 2009) lokal eine sehr heterogene Verteilung (Abb. 6, Seite 34).

Nur wenige Arbeitsgruppen beschreiben Unterschiede der Infektionsraten im jahreszeitlichen Verlauf oder zwischen verschiedenen Untersuchungsjahren. In Luxemburg trat eine unimodale Saisonalität mit einem Peak der Infektionen im September auf (Reye et al., 2010). Wir dokumentierten ebenfalls einen Anstieg der Infektionsrate im Jahresverlauf mit der höchsten Prävalenz im September/Okttober 2000 (Ilmtal) sowie September 2006 und August 2007 (Zeitzgrund) (Abb. 5, Seite 23). Die Unterschiede zwischen den beiden Jahren 2006 und 2007 waren nur gering ausgeprägt. Grzeszczuk und Stańczak fanden im Gegensatz dazu starke Schwankungen der Prävalenz von *A. phagocytophilum* innerhalb 4 verschiedener Untersuchungsjahre in Polen (Grzeszczuk und Stańczak, 2006).

Vogelassoziierte Zecken

In Europa betragen die Infektionsraten für Anaplasmen in *I. ricinus* Zecken, die an Vögeln parasitierten, je nach Region und untersuchten Vogelarten bis 14,3% (Bjoersdorff et al., 2001; Skotarczak et al., 2006; Paulauskas et al., 2009). Es gibt allerdings nur wenige Studien hierzu.

Wir erhoben mit unseren Untersuchungen der vogelassoziierten Zecken der Greifswalder Oie (Hildebrandt et al., 2010c; Franke et al., 2010c) und Reifenstein (Hildebrandt et al., 2011a; Franke et al., 2010a) erste Daten dieser Art für Deutschland. Dabei waren Anaplasmen in insgesamt 2,9% (11/380) der untersuchten Zecken nachweisbar (Abb. 6, Seite 34). Die 11 positiven Zecken (2 Larven, 9 Nymphen) stammten von 8 Vögeln 3 verschiedener Vogelarten (*Turdus merula*, *Turdus iliacus* und *Erithacus rubecula*). In allen Fällen bestätigte die Sequenzierung die Spezies *A. phagocytophilum*.

Eine transovarielle Übertragung der Anaplasmen findet in der Regel nicht statt, so dass infizierte Larven die Erreger vermutlich mit der Blutmahlzeit von den Vögeln aufgenommen hatten. Bei einer dieser beiden Larven ist die Transmission über *co-feeding* nicht auszuschließen, da am gleichen Vogel an benachbarter Stelle noch eine positive Nymphe saugte. Auch in anderen Untersuchungen war das Vorkommen von Anaplasmen in vogelassoziierten Zecken gering und betraf zumeist Nymphen (Alekseev et al., 2001; Bjoersdorff et al., 2001). Eine Studie aus Polen konnte demgegenüber in keiner der untersuchten Zecken und in keiner der Blutproben der Vögel *Anaplasma*-spezifische DNA nachweisen (Skotarczak et al., 2006). Andererseits fanden Paulauskas et al. (2009) in parasitierenden Zecken in einem Gebiet in Norwegen in 14,3% der Larven und 10,7% der Nymphen Erreger-spezifische DNA, während die Infektionsraten in einem anderen norwegischen Gebiet nur 1,9% in Larven und 2,0% in Nymphen betrug. Aus den Daten ist nicht ersichtlich, ob *co-feeding* eine Ursache für die verhältnismäßig hohe Prävalenz in den Larven sein kann, so dass eine Aussage zur Reservoirkompetenz nicht möglich ist.

Aus unseren Ergebnissen lässt sich nicht ableiten, dass Vögel kompetente Reservoirs für HGA-Erreger sind. Allerdings ist zumindest eine Funktion als Ko-Vektor anzunehmen, denn Zugvögel können infizierte Zecken über weite Strecken transportieren. Vögel spielen vermutlich auch eine Rolle als Wirte oder Reservoirs anderer *Anaplasma* und *Ehrlichia* spp. (Paulauskas et al., 2009). So fand eine russische Studie in 14% (8/57) der an Zugvögeln parasitierenden Zecken Anaplasmen, wobei eine PCR mit geringerer Spezifität auch Erreger der humanen monozytären Anaplasmosen (HMA) amplifizierte (Alekseev et al.,

2001). Um die Reservoirkompetenz der Vögel für *A. phagocytophilum* zu klären, sind xenodiagnostische Untersuchungen z.B. mit dem Nachweis und der Isolierung des Erregers aus Vögeln nach natürlicher oder experimenteller Infektion erforderlich (Bjoersdorff et al., 2001).

Kleinsäugerassoziierte Zecken

In Europa sind für Kleinsäuger je nach verwendetem Untersuchungsverfahren unterschiedliche Angaben zur Prävalenz von *A. phagocytophilum* in parasitierenden Zecken aber auch in den Wirtstieren selbst beschrieben. Eine Arbeitsgruppe in der Schweiz fand in kleinsäugerassoziierten Larven eine Prävalenz von 9,5% in gepoolten Zecken (Liz et al., 2000). In China ist der Erreger in 14,5% der untersuchten Kleinnagerspezies *Rattus norvegicus*, *Cricetulus migratorius*, *Apodemus peninsulae*, *Apodemus agrarius* und *Tscherskia triton* beschrieben (Zhan et al., 2010). *Anaplasma* spp. waren auch aus Blut, Leber-, Milz- und Ohrgewebe von Kleinsäufern nachweisbar (Liz et al., 2000; Bown et al., 2003; Štefančíková et al., 2008). In serologischen Untersuchungen betragen die Prävalenzen bis 13,4% (Štefančíková et al., 2008; Foley et al., 2008; Hartelt et al., 2008).

Unsere Ergebnisse zeigen eine sehr niedrige Infektionsrate für *Anaplasma* spp. in kleinsäugerassoziierten *I. ricinus* Zecken aus dem Untersuchungsgebiet in Reifenstein (Hildebrandt et al., 2011a; Franke et al., 2010a). Nur 3 Gelbhalsmäuse (3,2%) waren mit *A. phagocytophilum*-positiven Larven infestiert. Alle untersuchten Zecken von Rötelmäusen waren negativ, so dass die Gesamtinfektionsrate 1,1% (3/273) betrug (Abb. 6, Seite 34). Eine Übertragung des Erregers von den Kleinsäufern auf die Larven und damit auch eine Reservoirkompetenz der Nager ist denkbar.

Bei der geringen Infektionsrate ist es nicht ungewöhnlich, dass wir den Erreger in keinem der Ohrbiopate nachweisen konnten (Franke, 2010). Eine negative Gewebeprobe bedeutet nicht zwangsläufig, dass ein Tier nicht infiziert ist, da Anaplasmosen bei Kleinsäufern generell nur von kurzer Dauer sind, so dass eine zeitlich begrenzte Reservoirkompetenz besteht (Bown et al., 2003; Beugnet und Marie, 2009). Die *Anaplasma*-Infektionen der kleinsäugerassoziierten Zecken aus Reifenstein traten alle im Sommer auf, was die Vermutung von Beugnet und Marie (2009) stützt, dass Anaplasmen nicht in Kleinsäufern überwintern. In xenodiagnostischen Studien mit *I. scapularis* und der Weißfußmaus (*Peromyscus leucopus*) verhinderte die Immunantwort der Kleinsäuger nach mehrfacher Infektion die effiziente Übertragung des Erregers auf sterile Larven. Gleichzeitig erfolgte in dieser

Untersuchung erstmals experimentell der Nachweis des *co-feeding* für *A. phagocytophilum*, wobei sich signifikant weniger Larven an immunisierten Mäusen als an nicht immunisierten Mäusen infizierten (Levin und Fish, 2000).

Alle Infektionen unserer Studie traten in Gelbhalsmäusen auf. Untersuchungen aus Großbritannien und der Schweiz wiesen im Gegensatz dazu deutlich häufiger *Anaplasma*-Infektionen in Rötelmäusen und an Larven nach, die an ihnen parasitierten (Liz et al., 2000; Bown et al., 2003). Weitere vergleichbare Studien fehlen, so dass die beobachteten Unterschiede in der Reservoirkompetenz der Kleinsäugerarten auch aus den jeweiligen Habitatbedingungen resultieren können.

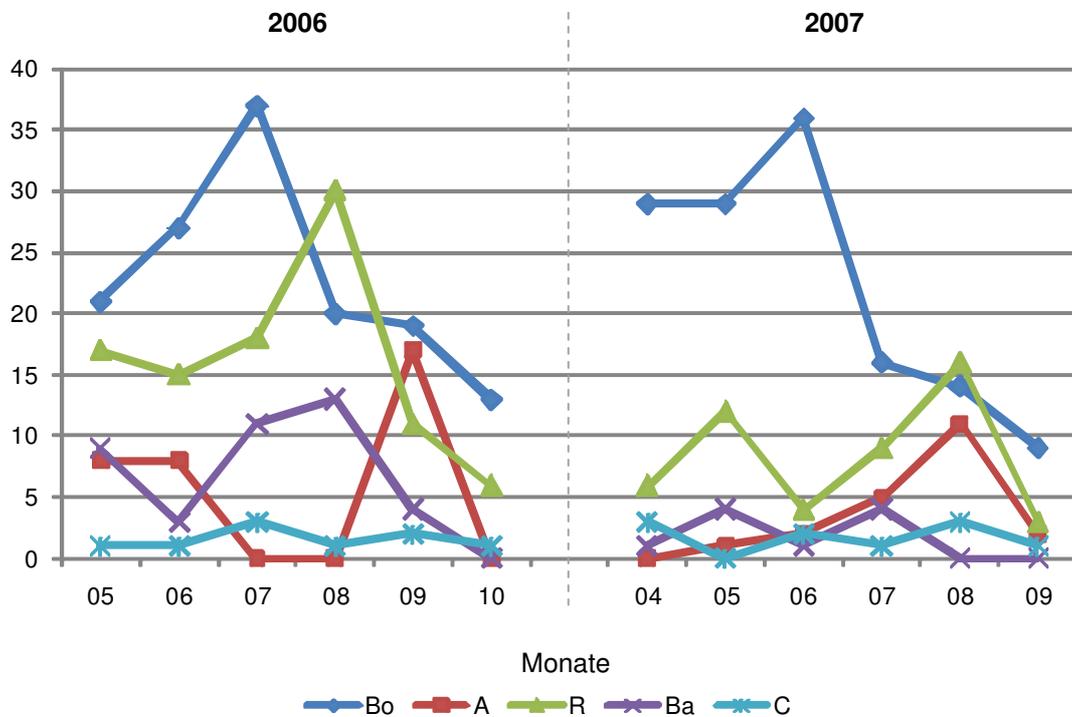


Abb. 5: Saisonales Muster der Infektionen im Zeitgrund

Im Zeitgrund traten in den Untersuchungsjahren 2006 und 2007 verschiedene saisonale Muster der folgenden Infektionen auf:

Bo - *Borrelia* spp.; Ba - *Babesia* spp.; A - *A. phagocytophilum*; R - *Rickettsia* spp.; C - *Coxiella burnetii*

Borrelia spp.: unimodaler Infektionsverlauf mit einem Peak im Juli 2006 und Juni 2007

A. phagocytophilum: unimodaler Infektionsverlauf mit einem Peak im September 2006 und August 2007

Rickettsia spp.: 2006: unimodaler Infektionsverlauf mit einem Peak im August; 2007: bimodaler Infektionsverlauf mit einem Peak im Mai und August

Babesia spp.: 2006: unimodaler Infektionsverlauf mit einem Peak im Juli/August, für 2007 ist aufgrund der geringen Infektionsrate keine Aussage zur Saisonalität möglich

Coxiella burnetii: Die geringe Infektionsrate lässt keine Aussagen zur Saisonalität zu. In beiden Untersuchungsjahren traten die Infektionen recht gleichmäßig im Jahresverlauf auf.

3.2 *Rickettsia* spp.

Zecken sind gleichzeitig Vektor und Reservoir für Spezies der SFG-Rickettsien, bei denen eine transovarielle Übertragung möglich ist (Parola et al., 2005b). Das Wissen über potentielle Reservoiertiere ist relativ gering. Nur Wirte mit einer stark ausgeprägten und persistierenden Rickettsiämie können eine Reservoirfunktion übernehmen (Raoult and Roux, 1997). Erste Berichte über den Nachweis von Rickettsien aus Vögeln stammen aus dem Jahr 1969 (Clifford et al., 1969). Bislang ist allerdings nicht gesichert, ob Vögel neben ihrer Bedeutung in der Verbreitung der Erreger (Santos-Silvia et al., 2006; Ioannou et al., 2009) auch ein Reservoir darstellen. Kleinsäuger gelten als Reservoir für *R. rickettsii* (Burgdorfer et al., 1966); für andere SFG-Rickettsien ist die Reservoirkompetenz bislang nicht bestätigt.

Für den molekularbiologischen Nachweis der Erreger eignen sich u.a. das 16S rRNA-Gen, das Zitratsynthase-Gen (*gltA*), verschiedene Oberflächenproteingene (z.B. *ompA*), die *rrl-rrf intergenic spacer* Region und das Rickettsien-spezifische 17 kDa-Protein-kodierende Gen *htrA* (Webb et al., 1990; Regnery et al., 1991; Roux et al., 1997; Marquez et al., 1998; Vitorino et al., 2003). Eine erst kürzlich von Boretti et al. (2009) entwickelte Real-Time PCR amplifiziert einen Bereich des 23S rRNA-Gens der in Deutschland am häufigsten vertretenen Spezies *R. helvetica* (Hartelt et al., 2004; Wölfel et al., 2006) und könnte sich in der Diagnostik der humanen Rickettsiose durch diesen Erreger als hilfreich erweisen. Wir amplifizierten in unseren Untersuchungen ein 340 bp großes Fragment des *gltA*-Gens nach dem Protokoll von Nilsson et al. (1999). Eine Bestätigung positiver PCR-Ergebnisse erfolgte in einem Restriktionsverdau mit dem Enzym *SspI* bzw. in der Sequenzierung. Die beiden Spezies *R. helvetica* und *R. monacensis* waren sicher von anderen SFG-Rickettsien abgrenzbar. Viele positive Amplifikate ordneten wir allerdings lediglich dem Genus *Rickettsia* zu, da sich die geringen genetischen Unterschiede im amplifizierten Zielgen nicht für eine differenziertere Speziesunterscheidung eignen (Hildebrandt et al., 2010b, c; 2011a).

Wirtssuchende Zecken

Rickettsien sind ähnlich wie Anaplasmen in Europa und auch innerhalb Deutschlands sehr heterogen verteilt. In Freilandzecken ist eine Prävalenz von 0% bis 38,5% beschrieben (Hartelt et al., 2004; Wölfel et al., 2006; Bertolotti et al., 2006; Barandika et al., 2008;

Blaschitz et al., 2008a; Stańczak et al., 2009; Kantsø et al., 2010; Halos et al., 2010, Reye et al., 2010). In einem Gebiet in den Niederlanden trat über einen Zeitraum von 9 Jahren eine ungewöhnlich hohe *R. helvetica*-Infektionsrate von 66% auf (Sprong et al., 2009). Koinfektionen verschiedener Rickettsienspezies sind ebenfalls möglich (Milhano et al., 2010).

Wir erhoben mit unseren Untersuchungen im Zeitzgrund (Hildebrandt et al., 2010b) und in Reifenstein (Hildebrandt et al., 2011a; Franke et al., 2010a) die ersten epidemiologischen Daten zur Prävalenz von SFG-Rickettsien für Thüringen. Im Zeitzgrund waren bei einer Infektionsrate von 14,7% (147/1000) signifikant häufiger Adulte (18,8%) als Nymphen (9,3%, $p=0,002$) infiziert. Innerhalb beider Untersuchungsjahre schwankte die Nachweisrate zwischen 10,1% (2007: 50/494) und 19,2% (2006: 97/506). Im Jahr 2006 zeigte sich ein unimodaler Infektionsverlauf mit einem Peak im August; 2007 war eine bimodale Saisonalität mit einem Peak im Mai und August zu beobachten (Abb. 5, Seite 23). In anderen Studien gibt es kaum Hinweise auf Unterschiede der Infektionsraten im jahreszeitlichen Verlauf oder zwischen verschiedenen Jahren. Lediglich in den Niederlanden ist eine im Verlauf von 9 Jahren relativ konstante Infektionsrate beschrieben (Sprong et al., 2009).

In Reifenstein waren 4,1% (8/196) der untersuchten Freilandzecken mit SFG-Rickettsien infiziert. In diesem Gebiet fanden wir einen höheren Anteil positiver Nymphen (6/162) im Vergleich zu Adulten (2/34). Dieser Unterschied war allerdings aufgrund der geringen Infektionsrate nicht signifikant ($p>0,05$). Silaghi et al. (2008b) beschreiben Prävalenzunterschiede in den verschiedenen Entwicklungsstadien mit signifikant häufigerem Nachweis von Rickettsien in adulten Zecken. Im Gegensatz dazu ist der Erreger in anderen Studien in Larven, Nymphen und adulten Zecken in gleicher Häufigkeit zu finden (Sprong et al., 2009; Reye et al., 2010). In beiden Untersuchungsgebieten dominierte *R. helvetica* (Abb. 6, Seite 34). Diese Spezies ist in Deutschland in 3,5-12% der Freilandzecken die häufigste und oftmals auch einzige detektierte SFG-Rickettsienspezies, gefolgt von *R. massiliae* in 1,7% und *R. monacensis* in 0,5-0,6% (Hartelt et al., 2004; Wölfel et al., 2006; Pichon et al., 2006; Silaghi et al., 2008b; Dobler und Wölfel, 2009).

Vogelassozierte Zecken

Zum Vorkommen von SFG-Rickettsien in vogelassozierten Zecken existieren nur begrenzt Daten, die zumeist auf der Untersuchung anderer Zeckenarten als *I. ricinus* beruhen (Clifford et al., 1969; Spitalska et al., 2006; Santos-Silva et al., 2006; Ioannou et al. 2009;

Graham et al., 2010). Aktuelle Untersuchungen aus an Zugvögeln parasitierenden *I. ricinus* Zecken weisen Infektionsraten von 11,3% (108/957) in Schweden und 15,1% (19/126) in Russland auf (Elving et al., 2010; Movila et al., 2011).

Mit unseren Ergebnissen tragen wir erste Daten dieser Art für Mitteleuropa bei. Von den 380 untersuchten Zecken der Greifswalder Oie (Hildebrandt et al., 2010c; Franke et al., 2010c) und Reifenstein (Hildebrandt et al., 2011a; Franke et al., 2010a) waren insgesamt 18 mit dem Erreger infiziert (4,7%). Die 5 positiven Larven und 13 Nymphen parasitierten an 13 Vögeln 5 verschiedener Vogelarten (*Turdus merula*, *Parus major*, *Turdus iliacus*, *Erithacus rubecula* und *Turdus philomelos*). Es waren 4,2% der Larven (5/119) und 5,0% (13/260) der Nymphen infiziert. Ein deutlicher Unterschied der Infektionsrate in den Entwicklungsstadien ist bei Elving et al. (2010) zu finden. Hier war Rickettsien-spezifische DNA in 6,8% (36/529) der Larven und 16,6% (68/409) der Nymphen nachweisbar. Im Gegensatz dazu traten in der Studie von Movila et al. (2011) nur parasitierende Nymphen auf, jedoch keine Larven. Vermutlich besitzen einige Vogelarten zumindest für eine Periode der Migration eine Wirtsspezifität für *I. ricinus* Nymphen (Hanincová et al., 2003a; Skotarczak et al., 2006).

Die Zecken der Greifswalder Oie (7,3%; 14/191) waren signifikant häufiger infiziert als Zecken aus Reifenstein (2,1%; 4/189; $p=0,011$). Generell scheinen v.a. Vögel der Gattung *Turdus* eine Bedeutung im Transmissionszyklus des Erregers zu haben. Alle 4 Rickettsien-Infektionen in Reifenstein traten im Frühjahr in Zecken auf, die an Amseln parasitierten. Diese Vögel haben vermutlich die Erreger aus ihren Überwinterungsgebieten mitgebracht, wobei Amseln nur Teilzieher sind. Wir fanden die Spezies *R. monacensis* häufiger als *R. helvetica*, viele Amplifikate waren allerdings nur dem Genus *Rickettsia* zuzuordnen (Abb. 6, Seite 34). In anderen Studien dominiert *R. helvetica*, seltener ist *R. monacensis* zu finden. Auch die in Afrika beheimatete *Amblyomma tholloni*-assoziierten Spezies *Rickettsia* sp. strain Davousti, *Rickettsia japonica* und *Rickettsia heilongjiangensis* sind in *Ixodes* Zecken nachweisbar (Elving et al., 2010; Movila et al., 2011). Interessanterweise fanden wir im Frühjahr auf der Greifswalder Oie besonders häufig *R. monacensis* – Verursacher des Mittelmeerfleckfiebers – in Zecken von Vogelarten, die diese Insel als Rastplatz auf ihrem Zug aus verschiedenen Regionen Süd- und Südwesteuropas nach Norden nutzen.

Drei Vögel waren mit mehreren Rickettsien-infizierten Zecken infestiert. An einer Amsel saugten zwei *R. monacensis* und eine *R. helvetica*-infizierte Nymphe; eine Kohlmeise und ein Rotkehlchen trugen jeweils eine *Rickettsia* spp.-positive Larve und Nymphe. Bei die-

sen Zecken ist nicht auszuschließen, dass sie die Infektion über *co-feeding* erworben haben. Für einige der Rickettsienspezies, u.a. auch für *R. helvetica*, ist eine transovarielle Übertragung beschrieben (Parola et al., 2005b), so dass infizierte Larven nicht eindeutig einen Rückschluss auf die Reservoirkompetenz zulassen (Raoult und Roux, 1997). Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, die eine wichtige Rolle von Zugvögeln in der Verbreitung von SFG-Rickettsien sehen (Ioannou et al., 2009; Elfving et al., 2010; Movila et al., 2011). Zugvögel tragen auch Spezies nach Mittel- und Nordeuropa, die dort ursprünglich nicht vorkommen.

Kleinsäugerassoziierte Zecken

Die Rolle von Kleinsäufern im Transmissionszyklus von SFG-Rickettsien ist bislang in nur wenigen Studien untersucht. Zhan et al. (2009) fanden eine Positivitätsrate von 9,1% (64/705) im Milzgewebe verschiedener Kleinnager. Alle Sequenzen ergaben die Zugehörigkeit zu *R. sibirica*, dem Verursacher des nordasiatischen oder sibirischen Zeckenbissfiebers. Die vorherrschende Zeckenspezies in Asien ist allerdings nicht *I. ricinus*. Stattdessen sind dort mehrere Spezies nebeneinander vertreten: *I. persulcatus*, *Dermacentor silvarum*, *Haemaphysalis concinna*, *H. longicornis* und *H. warburconi* (Zhan et al., 2009). Eine aktuelle Studie aus Polen identifizierte *R. helvetica* als einzige Rickettsienspezies in 2,1% der kleinsäugerassoziierten Larven und 8% der Nymphen (Stańczak et al., 2009). In Deutschland ist in einer aktuellen Studie der Nachweis von *R. felis* und *R. helvetica* in verschiedenen Kleinnagerspezies beschrieben (Schex et al., 2011), während *R. helvetica* in einer anderen deutschen Studie in keinem der untersuchten Kleinsäuger nachweisbar war (Hartelt et al., 2008).

Mit unseren Untersuchungen in Reifenstein stellen wir erstmals Daten über das Vorkommen von *Rickettsia* spp. in kleinsäugerassoziierten Zecken für Deutschland zur Verfügung (Hildebrandt et al., 2011a; Franke et al., 2010a). Wir fanden SFG-Rickettsien in 5 parasitierenden *I. ricinus* Larven (1,9%; 5/258). Somit trugen 3% (5/166) der Kleinsäuger (4 Gelbhalsmäuse, 1 Rötelmaus) *Rickettsia*-positive Larven. In der Sequenzierung konnten wir 4 Proben der Spezies *R. helvetica* zuordnen (Abb. 6, Seite 34). In den wenigen untersuchten kleinsäugerassoziierten Nymphen (n=13) und adulten Zecken (n=1) fanden wir keine Rickettsien-spezifische DNA. Aufgrund der Möglichkeit der transovariellen Übertragung einiger Spezies, wie sie u.a. auch bei *R. helvetica* stattfindet, sind die positiven Larven kein Beweis für eine Reservoirkompetenz der Nager. Verschiedene Studien be-

schreiben den Nachweis Erreger-spezifischer DNA in Blut sowie in Milz-, Leber- und Ohrbioptaten (Zhan et al., 2009; Stańczak et al., 2009; Schex et al., 2011). Die von uns untersuchten Ohrbioptate waren indes in der PCR alle negativ, was aus der sehr unterschiedlichen Dauer der Bakteriämie resultieren kann. Eine definitive Aussage über die Reservoirkompetenz erfordert xenodiagnostische Tests mit rickettsiämischen Kleinsäufern und sterilen Larven.

3.3 *Babesia* spp.

Ixodes ricinus ist in Europa als Vektor für die Übertragung pathogener Babesienspezies auf den Menschen von besonderer Bedeutung. Die meisten zoonotischen Spezies des sehr umfangreichen *B. microti*-Komplexes haben ihr Reservoir in Kleinnagern der Gattung *Microtus* (Goethert und Telford, 2003). Für *B. divergens* sind überwiegend Rinder Reserviertiere. *Babesia divergens*-ähnliche Spezies, wie *B. venatorum* (EU1), kommen zusätzlich auch in Rehwild vor (Zintl et al., 2003; Bonnet et al., 2007).

Neben der Mikroskopie ist die PCR eine wichtige Methode in der Diagnostik der intraerythrozytären Parasiten. Häufig verwendete PCR-Targets sind das 18S rRNA-Gen, das ITS1-5,8S-ITS2-Gen (ITS steht für *internal transcribed spacer*), das Hitzeschockprotein 70-Gen und das 28S rRNA-Gen (Persing et al., 1992; Armstrong et al., 1998; Blaschitz et al., 2008b). In den letzten Jahren unterscheiden europäische Studien immer häufiger neben *B. microti* und *B. divergens* auch die *B. divergens*-ähnliche Spezies EU1 (Casati et al., 2006; Bonnet et al., 2007; Wielinga et al., 2009; Reye et al., 2010). Es ist allerdings noch in der Diskussion, ob *Babesia* sp. EU1 tatsächlich als neue Spezies zu betrachten ist. Morphologische Kriterien, die serologische Kreuzreaktivität (Herwaldt et al., 2003), die Vektoridentität (Bonnet et al., 2009; Becker et al., 2009) und das Wirtsspektrum sind bei *B. divergens* und *Babesia* sp. EU1 identisch. *Babesia* sp. EU1 unterscheidet sich bislang lediglich in 31 Basenpaaren im 18S rRNA-Gen und kann im Gegensatz zu *B. divergens* im Experiment die mongolische Rennmaus (*Meriones unguiculatus*) nicht infizieren (Herwaldt et al., 2003).

Wir amplifizierten in unseren Untersuchungen einen 284 bp großen Abschnitt des 18S rRNA-Gens nach dem Protokoll von Hartelt et al. (2004). In der Sequenzanalyse war die Unterscheidung der beiden Spezieskomplexe *B. microti* und *B. divergens* möglich (Hildebrandt et al., 2010a, c; 2011a). Der gewählte Genabschnitt eignete sich allerdings

nicht zur Differenzierung von *B. divergens* und *Babesia* sp. EU1, da beide Spezies in diesem Bereich identisch sind.

Wirtssuchende Zecken

In Europa reicht die Prävalenz von *Babesia* spp. in Freilandzecken von 0,9% bis 20% (Skotarczak und Cichocka, 2001; Hartelt et al., 2004; Halos et al., 2005; Casati et al., 2006; Piccolin et al., 2006; Wielinga et al., 2009; Reye et al., 2010; Lempereur et al., 2011). Eine österreichische Arbeitsgruppe berichtet sogar über eine Infektionsrate von 51% bzw. regional bis 100% und sieht in der Zeckendichte im Untersuchungsgebiet den entscheidenden Faktor dafür (Blaschitz et al., 2008b). In Deutschland ist eine Babesien-Prävalenz von 1% in wirtssuchenden Zecken beschrieben (Hunfeld et al., 2002; Hartelt et al., 2004).

Wir wiesen mit unserer Arbeit diese Erregergruppe erstmals in Thüringen nach. Dabei betrug die Infektionsrate 5,0% (50/1000) im Zeitzgrund (Hildebrandt et al., 2010a) und 10,7% (21/196) in Reifenstein (Hildebrandt et al., 2011a; Franke et al., 2010a). Interessanterweise war im Zeitzgrund die Infektionsrate adulter Zecken (7,4%) signifikant höher als in Nymphen (1,9%, $p < 0,0001$), während wir den Erreger in Reifenstein signifikant häufiger in Nymphen (12,3%) als in Adulten (2,9%, $p = 0,01$) nachweisen konnten. In der Literatur lassen sich sehr unterschiedliche Verteilungsmuster der Infektionsrate in den verschiedenen Entwicklungsstadien finden. Blaschitz et al. (2008b) berichten über ein lokales Vorkommen des Erregers und einen Anstieg der Prävalenz mit zunehmender geographischer Höhe. Dabei sind Larven, Nymphen und beide Geschlechter adulter Zecken in gleicher Häufigkeit infiziert. Im Gegensatz dazu war in Stettin (Polen) eine Infektionszunahme im Laufe der Entwicklung zu beobachten. Babesien-spezifische DNA war in dieser Untersuchung in 2,1% der Larven, 11,1% der Nymphen und 20,3% der adulten Zecken nachweisbar (Skotarczak und Cichocka, 2001). Andere Studien bestätigen ebenfalls eine höhere Infektionsrate in adulten Zecken als in Nymphen. Cottè et al. (2010) und Reye et al. (2010) beobachteten demgegenüber ein umgekehrtes Verhältnis, d.h. einen höheren Anteil infizierter Nymphen.

Wir fanden im Zeitzgrund deutliche Unterschiede der Prävalenz zwischen den beiden Untersuchungsjahren 2006 (7,9%) und 2007 (2,0%). Die Verteilung der Infektionen im Jahresverlauf war im Jahr 2006 unimodal mit einem Peak im Hochsommer (Juli/August). Für 2007 ist eine Aussage zur Saisonalität aufgrund der geringen Infektionsrate nicht möglich (Abb. 5, Seite 23). Foppa et al. (2002) beschreiben ebenfalls Schwankungen der Prä-

valenz innerhalb verschiedener Untersuchungsjahre in Abhängigkeit von der jeweiligen Zeckendichte. Lediglich eine aktuelle Studie betrachtet den zeitlichen Verlauf der Infektionen innerhalb eines Jahres. Dabei trat ähnlich zu unseren Ergebnissen ein unimodales Muster mit einem Peak im September auf (Reye et al., 2010).

Im Zeitgrund war die Spezies *B. microti* (28/50) etwas häufiger vertreten als *B. divergens* (20/50). Für 2 Amplifikate war nur die Zuordnung zum Genus *Babesia* möglich. In Reifenstein waren *B. microti* (10/21) und *B. divergens* (11/21) in nahezu gleicher Häufigkeiten nachweisbar (Abb. 6, Seite 34). Die Speziesdifferenzierung verschiedener Untersuchungen lässt sich nur schwer miteinander vergleichen, da die PCR je nach gewähltem Target nur bestimmte Spezies erfasst. In den meisten europäischen Studien dominieren *B. divergens* oder *Babesia* sp EU1 (Hartelt et al., 2004; Blaschitz et al., 2008b; Cieniuch et al., 2009; Wielinga et al., 2009; Reye et al., 2010; Lempereur et al., 2011); vereinzelt überwiegt allerdings auch *B. microti* (Skotarczak und Cichocka, 2001).

Vogelassozierte Zecken

Vögel sind mit einem breiten Spektrum aviärer Babesien infiziert (Peirce, 2000; 2005). Das Vorkommen von *B. microti* und *B. divergens* in vogelassozierten Zecken ist bislang allerdings kaum untersucht. Die vorliegende Arbeit weist erstmals humanpathogene Babesien in vogelassozierten Zecken nach. Wir fanden auf der Greifswalder Oie (Hildebrandt et al., 2010c; Franke et al., 2010c) und in Reifenstein (Hildebrandt et al., 2011a; Franke et al., 2010a) in insgesamt 34 von 380 untersuchten, an Vögeln parasitierenden Zecken (8,9%) Babesien-spezifische DNA. Die infizierten 14 Larven und 20 Nymphen befanden sich an 24 Vögeln 6 verschiedener Arten (*Turdus merula*, *Pyrrhula pyrrhula*, *Prunella modularis*, *Parus major*, *Erithacus rubecula* und *Acrocephalus palustris*).

Amseln zeigten eine besonders hohe Infestation mit positiven Zecken (34,3%, $p=0,003$). Betrachtet man die Entwicklungsstadien, waren signifikant mehr Larven (14,2%) als Nymphen (6,5%, $p=0,011$) positiv. *Babesia divergens* (21/34) war häufiger vertreten als *B. microti* (12/34) (Abb. 6, Seite 34). Die beiden Spezieskomplexe verteilten sich relativ gleichmäßig auf die Entwicklungsstadien: so waren 6 Larven und 6 Nymphen mit *B. microti* infiziert bzw. 8 Larven und 13 Nymphen mit *B. divergens*. An einigen Vögeln fanden wir mehrere positive parasitierende Zecken. So trug eine Amsel 2 *B. divergens*-positive Larven, 1 *B. divergens*-positive Nymphe und 1 *B. microti*-positive Larve. Eine Amsel war mit 3 *B. divergens*-positiven Larven infestiert.

Vögel aus Reifenstein (13,2%) waren signifikant häufiger mit Babesien-positiven Zecken infiziert als Vögel der Greifswalder Oie (4,7%, $p=0,008$). Während in Reifenstein ein sehr breites Spektrum von Säugetierwirten zu finden ist, kommen auf der Greifswalder Oie nur Schafe und Siebenschläfer als potentielle Wirte vor. Es ist daher zu vermuten, dass Vögel einen Großteil der infizierten Zecken der Greifswalder Oie aus anderen Regionen Deutschlands oder Europas mitgebracht haben.

Die infizierten Larven können den Erreger transovariell oder durch *co-feeding* erworben haben. *Co-feeding* ist jedoch für Babesien bislang noch nicht als möglicher Übertragungsweg beschrieben. Aufgrund des komplexen Entwicklungszyklus der Parasiten ist dieser Transmissionsweg als unwahrscheinlich anzusehen. *Babesia divergens* infizierte Larven haben den Erreger nicht zwingend von ihrem Wirt aufgenommen, da diese Spezies transovariell übertragbar ist (Uilenberg, 2006; Bonnet et al., 2007). Für den Spezieskomplex *B. microti* ist eine transovarielle Übertragung nach derzeitigem Kenntnisstand nicht möglich (Homer et al., 2000; Gray und Weiss, 2008). Es existieren allerdings nur 3 Untersuchungen dazu, von denen 2 mehr als 20 Jahre zurückliegen (Walter und Weber, 1981; Spielman et al., 1984; Gray et al., 2002). Neue experimentelle Untersuchungen unter Einbeziehung des Aspektes, dass es sich bei *B. microti* um einen Komplex vieler Spezies handelt, sollten die Möglichkeit einer transovariellen Übertragung erneut beleuchten. Die von uns detektierten *B. microti*-positiven Larven können den Erreger während des Saugens von dem entsprechenden Vogel oder, bei unterbrochener Blutmahlzeit, von einem vorherigen Wirt aufgenommen haben.

In einer polnischen Studie untersuchten Skotarczak et al. (2006) 442 vogelassoziierte *I. ricinus* Zecken, in denen kein Nachweis Babesien-spezifischer DNA gelang. Die Autoren verwendeten in der PCR ebenfalls das 18S rRNA-Gen, allerdings amplifizierten sie ein sehr großes Fragment von 1650 bp. Das negative Ergebnis könnte daher auch Resultat einer geringen Sensitivität der PCR-Methode sein. Im Anschluss an unsere Arbeit (Hildebrandt et al., 2010c) ist inzwischen eine weitere Studie aus Russland publiziert, in der 2 von 126 (1,6%) der untersuchten vogelassoziierten *I. ricinus* Nymphen mit *Babesia* sp. EU1 infiziert waren (Movila et al., 2011). Zusammenfassend ist die Aussage möglich, dass Vögel eine wichtige Rolle in der Verbreitung der *B. microti* und *B. divergens*-Spezieskomplexe einnehmen. Die positiven *B. microti* Larven lassen eine Reservoirkompetenz der Vögel für diese Erreger vermuten, die Bestätigung erfordert allerdings xenodiagnostische Untersuchungen.

Kleinsäugerassoziierte Zecken

Der Nachweis Erreger-spezifischer DNA in verschiedenen Kleinsäugerspezies stützt die Annahme, dass Kleinsäuger ein Reservoir v.a. für *B. microti* darstellen (Siński et al., 2006b; Hunfeld et al., 2008). Nach experimenteller Infektion der Nager mit *B. microti* lässt sich eine Parasitämie für 4-6 Wochen im Giemsa-gefärbten Blutaussstrich und sogar für 3-4 Monate in der PCR verfolgen. Unter Verwendung einer *nested* PCR ist eine persistierende Infektion oftmals während der gesamten Lebenszeit einer Maus nachweisbar (Welc-Falęciak et al., 2007). Es gibt bislang allerdings kaum Studien über das Vorkommen von Babesien in Zecken, die an Kleinsäufern parasitieren.

In unserer Arbeit führen wir den Nachweis von *B. microti* und erstmals von *B. divergens* in kleinsäugerassoziierten Zecken: in Reifenstein waren 18 von 273 (6,6%) untersuchten parasitierenden Zecken (14 Larven, 4 Nymphen) positiv (Hildebrandt et al., 2011a; Franke et al., 2010a). Damit ist dies der in unserer Studie am häufigsten nachgewiesene Erreger in nagerassoziierten Zecken (zum Vergleich: Borrelien: 2,6%, Anaplasmen: 1,1%, Rickettsien: 1,8%, *Francisella tularensis*: 1,5%) (Abb. 6, Seite 34). Unter den 17 mit positiven Zecken infestierten Kleinsäufern (10,2%) waren 8 Gelbhalsmäuse (5,4%) und 9 Rötelmäuse (8,4%). Betrachtet man den jahreszeitlichen Verlauf der Infektionsrate, lässt sich ein Anstieg positiver Zecken vom Frühjahr (3,4%) zum Sommer (10,1%) beobachten. Ein Grund dafür könnte – ähnlich wie bei den Borrelien (Talleklint und Jaensos, 1995) – in einer höheren Mortalität infizierter Nager in den Wintermonaten liegen. Hinzu kommt, dass die Zecken in der kalten Jahreszeit weniger aktiv sind, so dass eine niedrigere Infektionswahrscheinlichkeit besteht (Gray et al., 2009). Zwei weitere Studien beschreiben ebenfalls eine jahreszeitliche Variation der *B. microti*-Infektionen in Kleinnagern mit einem Anstieg der Infektionsrate im Sommer (Krampitz, 1979; Bown et al., 2008).

Babesia microti (10/18) und *B. divergens* (7/18) traten in unseren Untersuchungen etwa gleich häufig auf (Abb. 6, Seite 34). Alle *B. divergens*- und 7 von 10 *B. microti*-positiven Zecken waren Larven; eine Gelbhalsmaus war mit 2 *B. divergens*-positiven Larven infestiert. Wir konnten in keinem der untersuchten Ohrbiotope Erreger-spezifische DNA nachweisen. Babesien sind typische intraerythrozytäre Parasiten, so dass Blut oder Gewebe für den Nachweis in der Regel besser geeignet sind.

Lediglich eine polnische Studie berichtet von einer *B. microti*-Infektion in 11,9%-35,4% der untersuchten Kleinsäuger sowie in parasitierenden *I. ricinus* Larven (3,4%) und Nymphen (4,8%). Exemplarisch sequenzierte PCR-Fragmente waren identisch mit dem zoonot-

ischen Stamm *B. microti* Gray (Acc.-Nr. AY693840) (Welc-Falęciak et al., 2008) und damit auch mit dem Stamm Jena (Acc.-Nr. EF413181), der Verursacher der ersten gesicherten autochthonen humanen *B. microti*-Infektion in Europa war (Hildebrandt et al., 2007).

Weitere vergleichbare Studien zu Babesien-Infektionen in kleinsäugerassoziierten Zecken fehlen, so dass sich unsere Ergebnisse nur mit direkten Untersuchungen verschiedener Kleinsäugerspezies in Verbindung bringen lassen. In Osteuropa untersuchten Siński et al. (2006b) Blut von Kleinsäugetieren und fanden *B. microti*-Infektionen in weniger als 1% der untersuchten Gelbhalsmäuse (*Apodemus flavicollis*), 12,8% der Feldmäuse (*Microtus arvalis*) und 42% der nordischen Wühlmäuse (*Microtus oeconomus*). Die Sequenzierung der positiven Amplifikate ergab eine Übereinstimmung mit dem nicht zoonotischen Stamm München (Acc.-Nr. AB071177). Eine deutsche Studie untersuchte Lungengewebe verschiedener Mäusearten und bestätigte die obigen Ergebnisse: Babesien-spezifische DNA war ausschließlich in der Familie Arvicolidae (Vertreter sind z.B. *Myodes glareolus*, *Microtus arvalis* und *Microtus agrestis*), nicht aber in der Familie Muridae (Vertreter sind z.B. *Apodemus flavicollis* und *Apodemus sylvaticus*) zu finden (Hartelt et al., 2008).

Die Vermutung, dass v.a. Wühlmäuse, nicht jedoch Langschwanzmäuse wie *Apodemus flavicollis* Reservoir für *B. microti* sind (Siński et al., 2006b), konnten wir in unseren Untersuchungen nicht bestätigen. Eine Arbeitsgruppe aus Slowenien berichtet von einer annähernd gleichmäßigen Verteilung der *B. microti*-Infektionen in Gelbhalsmäusen (11,8%) und Rötelmäusen (Duh et al., 2001); der kroatischen Arbeitsgruppe von Beck et al. (2011) gelang es sogar, den Erreger im Milzgewebe von Gelbhalsmäusen (16,2%) häufiger nachzuweisen als in Rötelmäusen (6%). Zwei der insgesamt 8 positiven Amplifikate waren ähnlich wie bei Siński et al. (2006b) dem nicht zoonotischen Stamm München (Acc.-Nr. AB071177) zuzuordnen. Die restlichen 6 Sequenzen stimmten mit dem zoonotischen Stamm Gray (Acc.-Nr. AY693840), d.h. auch mit dem Isolat Jena (Acc.-Nr. EF413181) überein. In unseren Untersuchungen lassen die 6 *B. microti*-positiven kleinsäugerassoziierten Larven eine Reservoirkompetenz der Nager vermuten. Für *B. divergens* ist eine transovariable Übertragung möglich, so dass die 8 infizierten Larven den Erreger nicht während der Blutmahlzeit vom Wirt aufgenommen haben müssen. Eine abschließende Aussage zur Reservoirkompetenz der Kleinsäuger für den *B. divergens* Spezieskomplex erfordert xenodiagnostische Untersuchungen.

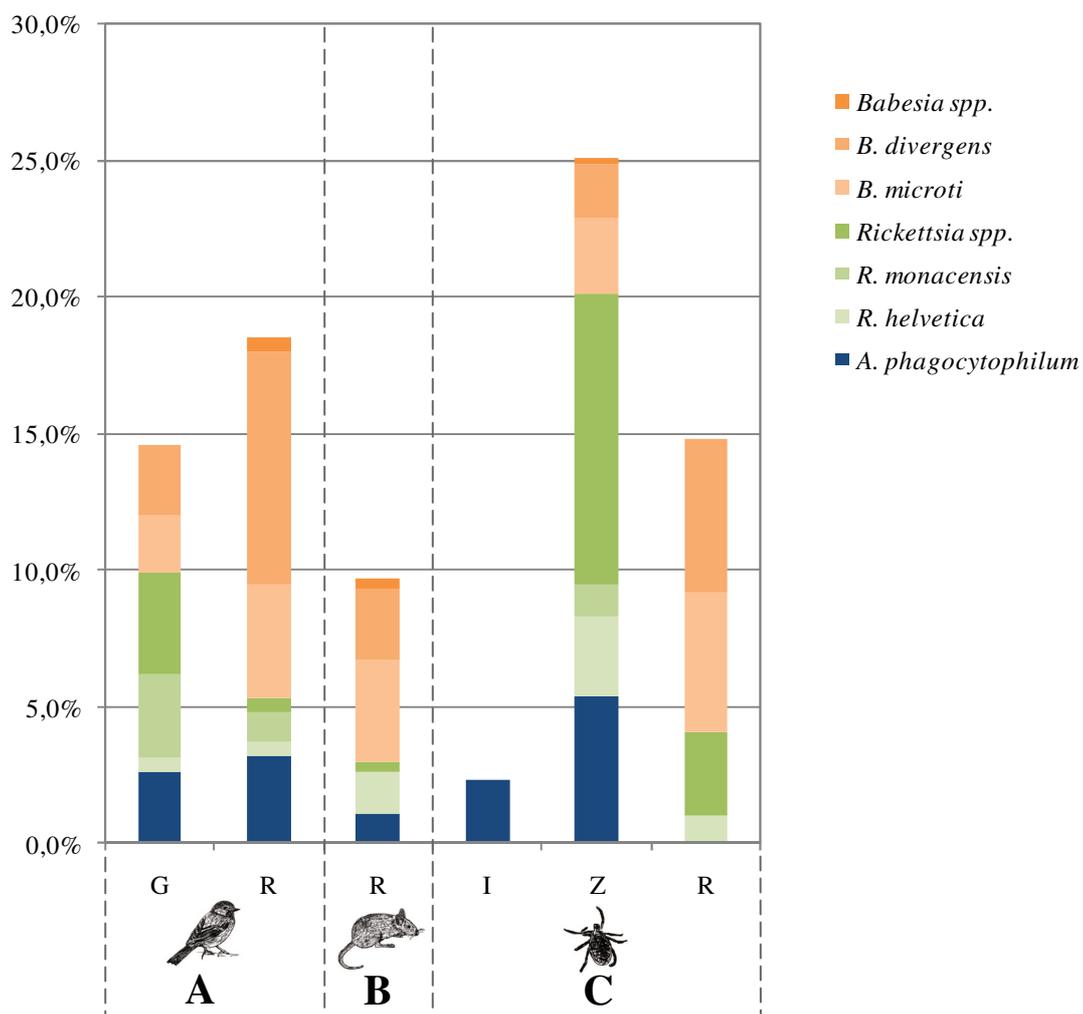


Abb. 6: Prävalenz der emerging pathogens *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp. in wirtssuchenden und parastierenden *I. ricinus* Zecken

Herkunft der Zecken: A - vogelassoziierte Zecken der Gebiete Greifswalder Oie (G) und Reifenstein (R);

B - kleinsäugerassoziierte Zecken des Gebietes Reifenstein (R);

C - Freilandzecken der Gebiete Ilmtal (I), Zeitzgrund (Z) und Reifenstein (R)

Die dieser Abbildung zugrunde liegenden Daten sind den Publikationen Hildebrandt et al, 2003, 2010a, b, c; 2011a; Franke et al., 2010a, c zu entnehmen.

3.4 Bedeutung der besprochenen *emerging pathogens* in Europa

3.4.1 Humane granulozytäre Anaplasmoze

Zahlreiche Nachweise belegen, dass *A. phagocytophilum*, SFG-Rickettsien und *Babesia* spp. in Europa in Zecken und verschiedenen potentiellen Reservoirtieren verbreitet sind. Serologische Studien bestätigen zusätzlich das Vorkommen der Pathogene beim Menschen. Allerdings sind verhältnismäßig wenige Fälle humaner granulozytärer Anaplasmoze, SFG-Rickettsiose und Babesiose dokumentiert.

Die mittlere Seroprävalenz für *A. phagocytophilum* beträgt in Europa 6,2% (Dumler et al., 2005) mit starken regionalen Unterschieden; eine Seropositivität bis zu 28% ist in Schweden dokumentiert (Ljunggren et al., 2010). Die Wahrscheinlichkeit der Serokonversion steigt mit dem Alter und der Intensität der Zeckenexposition (Chochlakis et al., 2009).

In Deutschland sind in 2 serologischen Studien Hinweise darauf zu finden, dass der Erreger hier ebenfalls in der Bevölkerung zirkuliert. Bei Waldarbeitern mit erhöhter Zeckenexposition betrug die Seroprävalenz 14%, bei LB-Patienten 11,4% und 1,9% bei Blutspendern (Fingerle et al., 1997). Eine prospektive Studie an asymptomatischen Soldaten berichtet von einer Serokonversionsrate mit spezifischem IgG von 6,4% pro Jahr und einer ähnlichen Rekonversionsrate (negatives IgG bei zuvor positivem Wert) von 6,6% (Woessner et al., 2001).

Im Gegensatz zu wesentlich häufigerem Auftreten humanpathogener Fälle in den USA sind in Europa gegenwärtig nur etwa 70 humane Fälle von HGA beschrieben; die Mehrheit stammt aus Zentraleuropa (Slovenia: Petrovec et al., 1997). In den Niederlanden, Spanien, Schweden, Norwegen, Kroatien, Polen, Österreich, Italien und Frankreich sind bislang lediglich wenige Einzelfälle nachgewiesen (Doudier et al., 2010). Die Ursachen für die geringe dokumentierte Erkrankungszahl sind vielfältig. Viele Infektionen verlaufen besonders mild oder werden aufgrund unzureichender Bekanntheit des Erregers sowie mangelnder diagnostischer Möglichkeiten nicht erkannt.

Die von uns molekularbiologisch charakterisierten Isolate aus dem Ilmtal (Acc.-Nr. AJ313513; AJ312941; AJ313512; AJ312939; AJ312940; AJ312942; AJ313511) zeigten genetische Unterschiede, deren Bedeutung noch weitgehend unklar ist (Hildebrandt et al., 2002). Eine veränderte Pathogenität von *A. phagocytophilum* in Europa könnte ebenfalls

für die geringe Anzahl klinischer HGA-Fälle eine Rolle spielen. Bedeutsam dafür ist u.a. das *ank*-Gen (*ank* steht für Ankyrin *repeats*). Dieses Gen weist eine hohe Konservierung auf, es existieren allerdings 3 verschiedene Klassen: je eine im Nordosten der USA, im hohen mittleren Westen der USA und in Europa. Das kodierte AnkA-Protein beeinflusst vermutlich die Genexpression der Wirtszelle. Die genaue Funktion des Proteins für die Erreger ist indes noch unklar. Zur Diskussion stehen gegenwärtig die Beeinflussung der Kommunikation mit der Wirtszelle über Ankyrine und die Regulation der Wirtszell-Transkription proinflammatorischer Zytokine (Caturegli et al., 2000; Massung et al., 2000).

3.4.2 Humane Rickettsiose

Die Seroprävalenz von SFG-Rickettsien ist nur vereinzelt aus dänischen, französischen, italienischen, deutschen und schwedischen Studien bekannt, in denen die Seropositivität der untersuchten Personengruppen bis 12,5% erreicht (Fournier et al., 2000; Nielsen et al., 2004; Cinco et al., 2006; Jansen et al., 2008; Elfving et al., 2008). Die Humanpathogenität von *R. helvetica* ist seit 1999 gesichert, nachdem der Nachweis spezifischer DNA in Patienten mit Perimyokarditis, in den Granulomen von Sarkoidosepatienten, in akut fiebrigen Patienten mit Eschars und in Aortenklappen gelang (Brouqui et al., 2007). *Rickettsia monacensis* konnte von Patienten aus Spanien mit Fieber, Kopfschmerzen, generalisiertem Ausschlag, Eschars oder Gelenkschmerzen isoliert werden (Jado et al., 2007).

In Deutschland existieren nur sehr wenige Hinweise auf autochthone oder importierte Rickettsiosen. In einer Untersuchung am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München waren bei 8 von 164 Reisenden (4,9 %) mit fieberhaften Infektionen nach Rückkehr aus den Tropen serologische Hinweise für eine akute Infektion mit SFG-Rickettsien zu finden (Dobler und Wölfel, 2009). Eine Studie aus Süddeutschland wies in 9,1% (26/286) der untersuchten Jäger Antikörper gegen SFG-Rickettsien nach, so dass diese Erregergruppe vermutlich in Deutschland endemisch ist und zu autochthonen Infektionen führen kann (Jansen et al., 2008). Der Beweis einer durch SFG-Rickettsien verursachenden Erkrankung ist jedoch erst geführt, wenn der aus Patientenmaterial isolierte Erreger die Koch'schen Postulate erfüllt. Diese Postulate dienen dazu, den ätiologischen Zusammenhang einer Infektion mit einer auslösenden Erkrankung zu bewerten (Tab. 2).

Koch'sche Postulate

1. Beim Erkrankten muss sich der Erreger regelmäßig nachweisen lassen, nicht jedoch beim Gesunden.
 2. Der Erreger muss sich vermehren und in Reinkultur isolieren lassen.
 3. Die Infektion eines geeigneten Versuchstieres mit dem Erreger muss typische Symptome der Krankheit hervorrufen.
 4. Der Erreger ist erneut im erkrankten Tier nachweisbar und identisch mit dem ursprünglich isolierten infektiösen Agens.
-

Tab. 2: Koch'sche Postulate für den Beweis der Infektionsätiologie einer Krankheit

Die ursprünglichen Postulate sind für verschiedene Erreger und die dafür zur Verfügung stehenden Untersuchungsmethoden in abgewandelter Form zu finden (Lipkin et al., 2010).

3.4.3 Humane Babesiose

Die bislang einzige umfangreiche Babesien-Seroprävalenzstudie stammt aus Deutschland. Darin wiesen 1,7% gesunder Blutspender und bis zu 11,4% Zecken exponierter Personen Antikörper gegen den Erreger auf (Hunfeld et al., 2002). Personen mit häufigen Aktivitäten im Freien haben durchschnittlich mehrere Zeckenstiche pro Jahr. Die Merzzahl der Betroffenen bemerkt eine Zeckeninfestation jedoch nicht (Wilske et al., 2000). Den überwiegenden Teil bisher aufgetretener humaner Babesiosen in Europa verursachte die Spezies *B. divergens* (Hunfeld et al., 2008). In 3 Fällen war *Babesia* sp. EU1 sicher als Krankheitsauslöser identifizierbar (Herwaldt et al., 2003; Häselbarth et al., 2007). Ein Bericht einer möglichen humanen *B. microti*-Infektion aus der Schweiz (Meer-Scherrer et al., 2004) ist umstritten, da die Titer im Immunofluoreszenztest sehr niedrig waren, die mikroskopisch sichtbaren intraerythrozytären Einschlüsse wie Thrombozyten erschienen, zum Zeitpunkt der vermeintlichen Parasitämie die PCR negativ war und keine Bestätigung eines zu einem späteren Zeitpunkt erhaltenen PCR-Produktes erfolgte (Gray, 2006).

Die in Jena im Jahr 2007 dokumentierte *B. microti*-Infektion einer immunsupprimierten Patientin mit akuter myeloischer Leukämie als Grunderkrankung ist der bislang erste und einzige gesicherte autochthone Fall in Europa (Hildebrandt et al., 2007). Das mikroskopische Bild zeigte eindeutige malariaähnliche intraerythrozytäre Einschlüsse (Abb. 7); interessanterweise war die PCR im gesamten Zeitraum der Parasitämie positiv, während ein serologischer Nachweis erst bei bereits wieder negativer Mikroskopie gelang (Tab. 3). Dieses dokumentiert anschaulich, dass eine Antikörperproduktion erst nach Eliminierung parasitärer DNA aus dem peripheren Blut nachweisbar war. Die Sequenz des positiven Amplifikates (Acc.-Nr. EF413181) zeigte eine 100%-ige Übereinstimmung mit dem zoonotischen Isolat Gray (Acc.-Nr. AY693840), das auch in anderen Ländern Europas in

I. ricinus Zecken vorkommt (Siński et al., 2006b; Beck et al., 2011). Die Patientin erhielt Bluttransfusionen, an denen insgesamt 44 Spender beteiligt waren. In der Rückstellprobe eines Spenders ohne Auslandsanamnese fanden wir einen grenzwertig reaktiven IFT-Titer von 1:32 für *Babesia microti*-spezifisches IgG. Die Patientin hatte den Erreger daher mit großer Wahrscheinlichkeit über diese infizierte Blutkonserve erworben. Die Umstände, dass es sich um eine Patientin mit eingeschränkter Mobilität handelte, die sich nicht in der Natur aufhielt und dass die Infektion in den Wintermonaten mit niedriger Zeckenaktivität erfolgte, unterstreichen diese Schlussfolgerung.

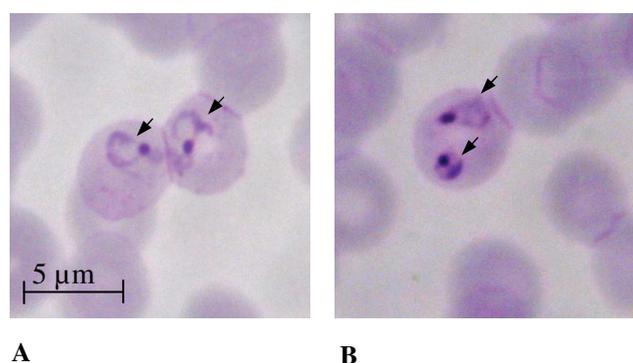


Abb. 7: *Babesia microti*-Infektion: Giemsa-gefärbter Blutausschlag

Die Pfeile markieren charakteristische Ringformen (Trophozoiten) der im Durchmesser 1-2,5 µm großen Parasiten. Erythrozyten können einfach (A) und auch mehrfach (B) infiziert sein.

Zeit (in Wochen)	Parasitämie ^a	PCR ^b	Serologie ^c
stationäre Aufnahme	4,50%	positiv	negativ
1	3,40%	positiv	negativ
3	0,60%	positiv	negativ
4	0,15%	positiv	negativ
6	0%	negativ	IgG 1:128

Tab. 3: *Babesia microti*-Infektion: Verlauf der Parasitämie, PCR und Serologie

^a Mikroskopisch sichtbare parasitierte Erythrozyten im Verhältnis zu nicht parasitierten Erythrozyten im Giemsa-gefärbten Blutausschlag

^b Babesien-spezifische PCR mit dem 18S rRNA-Gen als Target

^c Serologische Testung auf spezifische IgG- und IgM-Antikörper mit einem indirekten Immunfluoreszenztest (IFT) für *Babesia microti* und *Babesia divergens*

Transfusionen serologisch positiver, aber klinisch unauffälliger Spender sind eine bekannte Übertragungsquelle für Babesien-Infektionen. Zwischen 1979 und 2006 traten mehr als 70 dokumentierte Fälle in den USA auf, in denen eine Übertragung von *B. microti* über Blut-

produkte nachweisbar war. In den letzten Jahren wurden jährlich etwa 10 Fälle in Amerika registriert (Gubernot et al., 2009). Die tatsächliche Anzahl dürfte jedoch höher liegen, da die Erkrankung landesweit nicht einheitlich meldepflichtig ist. Bisher existieren keine standardisierten Screeningtests oder Verfahren zur Inaktivierung der Parasiten (Leiby, 2006), so dass die Gefahr einer transfusionsassoziierten Erkrankung immunsupprimierter Patienten auch in Europa besteht. In Deutschland traten die ersten beiden humanpathogenen Erkrankungen in Regionen auf, in denen zuvor keine Informationen über das Vorkommen der Erreger in Freilandzecken vorlagen (Hildebrandt et al., 2008). Das Risiko, die Infektion über einen Zeckenstich oder eine Bluttransfusion zu bekommen, ist in den meisten Regionen Europas nicht bekannt oder wird unterschätzt. Neben einer systematischen Untersuchung zum Vorkommen des Erregers in Zecken verschiedener Regionen ist eine Sensibilisierung für diese Erkrankung und die Entwicklung verlässlicher diagnostischer Tests dringend zu fordern.

3.5 Selten in *Ixodes ricinus* Zecken nachgewiesene *emerging pathogens*

3.5.1 *Coxiella burnetii*

Coxiella burnetii ist vorwiegend in *Dermacentor* spp. zu finden (Maurin und Raoult, 1999). Vereinzelte Nachweise in *I. ricinus* stammen aus Österreich (Rehàcek et al., 1994; Stanek 2009), Deutschland (Hellenbrand et al., 2001), der Slowakei und Ungarn (Rehàcek und Brezina, 1973; Špitalskà und Kocianovà, 2003; Smetanovà et al., 2006). In anderen Studien war *C. burnetii* in keiner der untersuchten *I. ricinus* Zecken nachweisbar (Burgdorfer et al., 1979; Rehàcek et al., 1993; Reye et al., 2010). In Deutschland fiel bereits 1977 eine Übereinstimmung der geographischen Verbreitung von *Dermacentor marginatus* mit den Q-Fieberinfektionen beim Menschen in vielen Teilen Süddeutschlands auf (Liebisch, 1977; Hellenbrand et al., 2001; Hartelt et al., 2008). Vereinzelt gelang der Nachweis von *C. burnetii* in *I. ricinus* Zecken in Baden-Württemberg (Hengel et al., 1950), Nordrhein-Westfalen (Schaaf, 1961), Hessen (Thoms, 1996) und Thüringen (Kramer, 1990). Rinder und Schafe, seltener auch Rot- und Schwarzwild sowie Wildschweine verschiedener Regionen Thüringens sind als seropositiv identifiziert (Kramer, 1991; Lange und Klaus, 1992).

In den letzten beiden großen Q-Fieber-Ausbrüchen in Deutschland, in Jena und Soest, erfolgte eine Infektion des Menschen durch direkten oder indirekten Kontakt mit infizierten

Tieren (v.a. Schafen). In beiden Regionen kommt *D. marginatus* nicht vor, so dass *I. ricinus* vermutlich eine Vektorrolle eingenommen hat. In unseren Untersuchungen waren das Transposase Element *IS1111* und das Isocitratdehydrogenase-Gen (*icd*) Target einer TaqMan-basierten Real-Time PCR nach dem Protokoll von Klee et al. (2006). Eine Serienverdünnung von Plasmiden mit geklonten *icd* Fragmenten ermöglichte eine Quantifizierung der Erreger (Hildebrandt et al., 2011b).

Im Zeitgrund waren überraschenderweise 19 von 1 000 *I. ricinus* Zecken mit *C. burnetii* infiziert (10 Nymphen, 9 Adulte). Die Infektionen traten gleichmäßig innerhalb der Untersuchungsjahre 2006 und 2007 ohne ein erkennbares saisonales Muster auf (Abb. 5, Seite 23). Innerhalb der Zecken findet eine Vermehrung und Virulenzsteigerung der Erreger statt. In *D. marginatus* beträgt die Erregerkonzentration im Durchschnitt 10^7 GE (genomisches Äquivalent), mit dem Kot scheiden die Zecken sogar bis zu 10^{12} Erreger/g aus (Liebisch, 1977; Nassal, 1982; Schliesser, 1991; Klee et al., 2006). Wir fanden in allen positiven *I. ricinus* Zecken einen annähernd konstanten Wert von 4×10^5 GE pro Zecke, so dass eine Konzentration des Bakteriums von ca. 10^7 /g Kot denkbar ist. Diese Annahme stützt die Aussage, dass *I. ricinus* weniger gut als Vektor und Reservoir für dieses Bakterium geeignet ist als *D. marginatus*.

Bisher existieren keine Daten zu möglichen Koinfektionen von *C. burnetii* mit anderen zeckenassoziierten Pathogenen in *I. ricinus* Zecken. In unserer Arbeit berichten wir erstmals über die Koexistenz eines sehr breiten Spektrums anderer Erreger: in 10 *Coxiella*-positiven Zecken fanden wir zusätzlich *Borrelia afzelii* (2 Nymphen), *Borrelia garinii* OspA-Typ 6 (1 adultes Männchen), *Borrelia garinii* OspA-Typ 7 (1 adultes Männchen), *Borrelia burgdorferi* (2 Nymphen), *Borrelia valaisiana* (1 adultes Männchen), *Babesia microti* (1 adultes Weibchen), *Borrelia garinii* OspA-Typ 6/*Borrelia burgdorferi* (1 Nymphe) und *Borrelia burgdorferi*/*Rickettsia helvetica* (1 Nymphe). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass bei Menschen, die engen Kontakt zu infizierten Zecken und Tieren haben, die Gefahr von Koinfektionen mit *C. burnetii* und anderen zeckenassoziierten Pathogenen besteht.

3.5.2 *Francisella tularensis*

Gelegentlich ist *Francisella tularensis* in *I. ricinus* Zecken in Tschechien und der Slowakei (Hubálek et al., 1990), der Schweiz (Wicki et al., 2000), Serbien (Milutinovic et al., 2008) und Österreich (Stanek, 2009) zu finden. Wir konnten in unseren Untersuchungen den Er-

reger erstmals in wirtssuchenden und parasitierenden *I. ricinus* Zecken in Deutschland nachweisen. Target einer TaqMan basierten Real-Time PCR waren das 17 kDa Lipoprotein-Gen *tul4* und das Insertionselement *ISFtu2* in den Untersuchungen aus Reifenstein (Franke et al., 2010a) nach dem Protokoll von Versage et al. (2003) bzw. ein Abschnitt des 16S rRNA-Gens in den Untersuchungen im Zeitzgrund (Hildebrandt et al., 2011c) entsprechend dem Protokoll von Kaysser et al. (2008).

In Reifenstein fanden wir *F. tularensis* in 3 Freilandzecken (1,5%, 3/192), 2 vogelassoziierten Zecken (1,1%, 2/180) und 4 kleinsäugerassoziierten Zecken (1,5%, 4/264). Interessanterweise trug 1 Gelbhalsmaus 3 infizierte Larven (Franke et al., 2010a). In den Zecken aus dem Zeitzgrund war der Erreger demgegenüber nicht nachweisbar (Hildebrandt et al., 2011c). In der Slowakei und in Tschechien sind in endemischen Regionen bis zu 10% der Zecken infiziert; allerdings handelt es sich hierbei zumeist um *D. reticularis* und nicht um *I. ricinus* (Gurycova et al., 2001). In einer bisher unpublizierten Studie (persönliche Kommunikation mit Dr. W. Splettstößer, München) war in keiner der untersuchten 2000 Zecken aus verschiedenen Regionen Deutschlands *F. tularensis* nachweisbar, was unsere negativen Ergebnisse im Zeitzgrund bestätigt und die Annahme stützt, dass der Erreger eine fokale Verbreitung aufweist (Kaysser et al., 2008).

Vögel können eine Rolle in der Verbreitung von *F. tularensis* spielen. Raubvögel, Rabenvögel und Möwen sind in der Regel resistent gegenüber Tularämieinfektionen (außer bei starker Immunsuppression), scheiden den Erreger allerdings über den Kot aus (Mörner und Mattson, 1988). In einer Studie aus Deutschland wurden 386 Kleinsäuger und 432 Ektoparasiten mittels PCR auf *F. tularensis*-spezifische DNA untersucht. Dabei war der Erreger in 4,9% der Gewebeproben (Leber, Milz) von Rötelmäusen (*Myodes glareolus*), Ostschemäusen (*Arvicola terrestris*), Feldmäusen (*Microtus agrestis*), Erdmäusen (*Microtus arvalis*) und Gelbhalsmäusen (*Apodemus flavicollis*) nachweisbar, jedoch nicht in Ektoparasiten (Zecken, Flöhe). Der fehlende Nachweis von Antikörpern in den Kleinsäufern spricht dafür, dass die Infektion meist letal ist und Nager daher als Reservoir wenig geeignet sind (Kaysser et al., 2008).

Die Bedeutung der transovariellen Übertragung für die Verbreitung des Erregers ist unklar, auch wenn dieser Transmissionsweg experimentell möglich ist (Hopla, 1953). *Ixodes ricinus* kann bis zu 10^7 infizierte *F. tularensis*-Zellen nach einer Blutmahlzeit an einer terminal erkrankten Maus enthalten. Eine hohe Positivitätsrate nach mehr als einem Monat und eine transstadielle Übertragung des Erregers innerhalb der Zecke sind für einen

Zeitraum von mehr als 1 Jahr nach der Infektion bestätigt (Výrosteková, 1994). Aufgrund des lokal begrenzten Auftretens von *F. tularensis* ist die Konzentration auf Regionen in Deutschland, in denen Tularämie-Fälle regelmäßig oder sporadisch auftreten, ein neuer Ansatz zur Untersuchung möglicher Vektoren und Reservoirtiere.

3.5.3 *Bartonella* spp.

Bartonella spp. war nicht Bestandteil unserer Untersuchungen. Einige Studien berichten über den Nachweis des Erregers dieses Genus in *Ixodes* spp. (Halos et al., 2005; Hercík et al., 2007; Podsiadly et al., 2009; Cottè et al., 2010; Dietrich et al., 2010; Reye et al., 2010). Auch Koinfektionen mit anderen zeckenübertragenen Pathogenen sind beschrieben (Adelson et al., 2004; Halos et al., 2005; Holden et al., 2006). Sanogo et al. (2003) identifizierten *Bartonella henselae*, den Erreger der Katzenkratzkrankheit, in an Menschen parasitierenden *I. ricinus* Zecken; allerdings trat dabei keine Übertragung auf. Trotzdem die Vektorkompetenz von *I. ricinus* für *Bartonella henselae* unter den Bedingungen eines künstlichen Saugsystems gezeigt werden konnte (Cottè et al., 2008), bedeutet die Anwesenheit eines infektiösen Agens bzw. der Nachweis spezifischer DNA nicht gleichzeitig, dass eine Übertragung während der Blutmahlzeit auf Tier oder Mensch möglich ist. Nach Diskussion der aktuellen Literatur kommen Telford und Wormser (2010) zu dem Ergebnis, dass eine Vektorrolle der Zecken für diese Erregergruppe bislang nicht ausreichend bewiesen ist.

4. Koinfektionen

Dieser Abschnitt bezieht sich auf folgende Originalarbeiten:

Hildebrandt A, Schmidt KH, Wilske B, Dorn W, Straube E, Fingerle V. 2003. Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and coinfection with *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes ricinus* ticks in Central Germany (Thuringia). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 22:364-367. (OA2)

Hildebrandt A, Franke J, Schmoock G, Pauliks K, Krämer A, Straube E. 2011c. Diversity and co-existence of tick-borne pathogens in Central Germany. *J Med Entomol*, 48: 651-655. (OA10)

Franke J, Fritsch J, Tomaso H, Straube E, Dorn W, Hildebrandt A. 2010a. Co-existence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat of Central Germany. *Appl Environ Microbiol*, 76:6829-6836. (OA11)

Franke J, Meier F, Moldenhauer A, Straube E, Dorn W, Hildebrandt A. 2010c. Established and emerging pathogens in *Ixodes ricinus* ticks collected from birds on a conservation island in the Baltic Sea. *Med Vet Entomol*, 24:425-432. (OA13)

Welc-Fałęciak R, Hildebrandt A, Siński E. 2010. Co-infection with *Borrelia* species and other tick-borne pathogens in humans: two cases from Poland. *Ann Agric Environ Med*, 17:63-67. (OA14)

Der Nachweis verschiedener Pathogene in nüchternen Nymphen und adulten Zecken weist auf eine simultane transstadielle Übertragung der Erreger hin. Mischinfektionen in ungesogenen Larven zeigen die Möglichkeit einer simultanen transovariellen Erregerübertragung auf (Korenberg, 2004). Koinfektionen des Menschen mit verschiedenen zeckenassoziierten Erregern führen häufig zu einer größeren Vielfalt des klinischen Verlaufs, wodurch sich sowohl diagnostische als auch therapeutische Herausforderungen ergeben (Benach et al., 1985; Krause et al., 1992, 1996, 2002; Nadelman et al. 1997; Thomas et al., 2001; Oleson et al. 2003, Swanson et al., 2006). Daten zur Prävalenz beruhen in der Regel auf serologischen Studien an Patienten mit nachgewiesener oder vermuteter Borreliose. Im Falle einer positiven Serologie für verschiedene Erreger ist allerdings keine Unterscheidung zwischen einer simultanen oder sequentiellen Infektion möglich (Swanson et al. 2006).

Eine aktuelle Studie aus Polen untersuchte Patienten mit einem hohen Zeckenexpositionsrisiko und klinischen (EUCALB, <http://www.oeghmp.at/eucalb/>) sowie labordiagnostisch gesicherten (ELISA, Westernblot und/oder PCR) Hinweisen auf weitere zeckenassoziierte Erreger. Eine wesentliche Untersuchung dieser Studie war die Mikroskopie eines Giemsa-gefärbten Blutausstriches. In unserem Labor konnten wir bei einem der Patienten mit granulozytären Einschlüssen in einer spezifischen PCR und anschließender Sequenzierung *A. phagocytophilum* nachweisen. Ein anderes mikroskopisches Bild mit intraerythrozytären Ringformen identifizierten wir als erste humane *Babesia* spp.-Infektion in Polen. Der asymptomatische Patient hatte eine niedrige Parasitämie von 0,02%. Die Speziesidentifizierung ergab *B. divergens*, wobei keine Unterscheidung zu *Babesia* sp. EU1 möglich war.

Ein molekularbiologischer Nachweis dieser beiden Kombinationen *Borrelia* spp./*A. phagocytophilum* und *Borrelia* spp./*Babesia divergens* weist auf die Möglichkeit aktiver Koinfektionen hin, und zwar unabhängig davon, ob die Patienten diese Infektionen simultan oder sequentiell erworben haben (Welc-Fałęciak et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit fanden wir in allen Untersuchungsgebieten sowohl Borrelien-Mischinfektionen (Hildebrandt et al., 2003, 2010a; Franke et al., 2010a, b) als auch Koinfektionen verschiedener Erreger (Hildebrandt et al., 2003, 2010a, b, c; 2011a, b, c; Franke et al., 2010a, c).

Wirtssuchende Zecken

In Freilandzecken sind verschiedene Kombinationen von Koinfektionen bekannt:

- *Borrelia* spp./*A. phagocytophilum* (Cinco et al., 1997; Fingerle et al., 1999; Skotarczak et al., 2003; Stańczak et al., 2004; Piccolin et al., 2006; Milutinović et al., 2008; Menardi et al., 2008; Reye et al., 2010),
- *Borrelia* spp./*Rickettsia* spp. (Reye et al., 2010),
- *Borrelia* spp./*Babesia* spp. (Belongia, 2002; Skotarczak et al., 2003; Stańczak et al., 2004; Piccolin et al., 2006; Reye et al., 2010) und
- *A. phagocytophilum*/*Babesia* spp. (Stañczak et al., 2004; Reye et al., 2010).

Koinfektionen mit *Babesia* spp. sind zumeist nur für die Spezies *B. microti* bekannt. Die einzig beschriebene 3-fach-Infektion in *I. ricinus* ist die Kombination:

- *Borrelia* spp./*A. phagocytophilum*/*Babesia* spp. (Skotarczak et al., 2003; Piccolin et al., 2006; Wójcik-Fatla et al., 2009; Reye et al., 2010).

Wir untersuchten ungesogene wirtssuchende Nymphen und adulte Zecken, die im Laufe ihrer Entwicklung bereits an 1 bzw. 2 Wirten parasitiert hatten. Mischinfektionen können durch einen gemeinsamen Wirt oder durch verschiedene Wirte entstanden sein. Für einige Erreger ist zusätzlich der transovarielle Übertragungsweg möglich. Der Anteil der Mehrfachinfektionen verschiedener Borrelienspezies betrug in den untersuchten Freilandzecken 1,3% (4/305) im Ilmtal (Hildebrandt et al., 2003) und 1,4% (14/1000) im Zeitgrund (Hildebrandt et al., 2010a). Es dominierte die Kombination der beiden häufigsten Spezies *B. garinii*/*B. burgdorferi*. Unter den Koinfektionen verschiedener Erreger war die einzige im Ilmtal untersuchte Kombination *Borrelia* spp./*A. phagocytophilum* in 0,7% (2/305) der

Zecken zu finden (Hildebrandt et al., 2003). In Reifenstein traten Koinfektionen in 1,5% (3/196) der Zecken in den folgenden Kombinationen auf:

- *Borrelia burgdorferi/Babesia divergens* (1),
- *Rickettsia* spp./*Babesia divergens* (1) und
- *Borrelia valaisiana/Rickettsia* spp. (1) (Hildebrandt et al., 2011a; Franke et al., 2010a).

Ein wesentlich breiteres Spektrum an Koinfektionen fanden wir im Zeitgrund. Hier waren 91 (9,1%) der untersuchten Zecken koinfiziert, signifikant mehr Adulte (12,6%, 72/570) als Nymphen (4,4%, 19/430, $p=0,001$). In den 2-fach Infektionen waren folgende Kombinationen vertreten:

- *Borrelia* spp./*Rickettsia* spp. (30),
- *Borrelia* spp./*A. phagocytophilum* (12),
- *Rickettsia* spp./*Babesia* spp. (12),
- *Borrelia* spp./*Babesia* spp. (10),
- *Borrelia* spp./*C. burnetii* (8),
- *A. phagocytophilum/Rickettsia* spp. (5),
- *A. phagocytophilum/Babesia* spp. (1) und
- *C. burnetii/Babesia* spp. (1).

Die beschriebene 3-fach-Infektion *Borrelia* spp./*A. phagocytophilum/Babesia* spp. trat bei unseren Untersuchungen nicht auf. Stattdessen wiesen wir erstmals andere Kombinationen aus 3 Erregern nach:

- *Borrelia* spp./*Rickettsia* spp./*Babesia* spp. (6),
- *Borrelia* spp./*A. phagocytophilum/Rickettsia* spp. (4),
- *A. phagocytophilum/Rickettsia* spp./*Babesia* spp. (1) und
- *Borrelia* spp./*C. burnetii/Rickettsia* spp. (1).

Die Verteilung der Borrelien- und Babesienspezies in diesen Koinfektionen ist in Tabelle 4 dargestellt.

Koinfektion (Anzahl)	<i>Borrelia</i> spp.								<i>Babesia</i> spp.		
	afz	bu	gar	bav	val	lus	gar/afz	gar/bu	mic	div	n.i.
	ny/a								ny/a		
Bo/A (12)	0/2	2/0	1/4	-	0/1	-	0/1	1/0			
Bo/R (30)	0/5	2/3	1/14	-	1/2	0/1	-	0/1			
**Bo/C (8)	2/0	2/0	0/2	-	0/1	-	-	1/0			
*Bo/A/R (4)	-	0/1	0/2	-	1	-	-	-			
**Bo/C/R (1)	-	1/0	-	-	-	-	-	-			
Bo/Ba (10)	0/2	0/2	0/4	0/1	0/1	-	-	-	0/4	0/6	-
**Bo/R/Ba (6)	0/1	0/3	0/1	-	-	-	-	0/1	0/6	-	-
R/Ba (12)									2/4	1/4	0/1
**C/Ba (1)									0/1	-	-
A/Ba (1)									-	0/1	-
**A/R/Ba (1)									0/1	-	-
A/R (5)											
total (91)	12	16	29	1	7	1	1	4	18	12	1

Tab. 4: Verteilung der Borrelien- und Babesienpezies in den Koinfektionen der Freilandzecken aus dem Zeitgrund

Bo - *Borrelia* spp.; A - *A. phagocytophilum*; R - *Rickettsia* spp.; Ba - *Babesia* spp.; C - *C. burnetii*; ny - nymphs; a - adults
Borrelia spp.: afz - *B. afzelii*; bur - *B. burgdorferi*; gar - *B. garinii*; bav - *B. bavariensis*; val - *B. valaisiana* Subtyp I und II;
 lus - *B. lusitaniae*

Babesia spp.: mic - *B. microti*; div - *B. divergens*; n.i. - *Babesia* spp.

* Václav et al. (2011) fanden diese Erreger-Kombination etwa gleichzeitig zu unserer Arbeit in an Eidechsen parasitierenden *I. ricinus* Zecken

** erstmals in *I. ricinus* beschriebene Erreger-Kombination

Die dieser Tabelle zugrunde liegende Daten sind den Publikationen Hildebrandt et al., 2010a, b; 2011b, c zu entnehmen.

Die Erregerkombinationen aller 91 koinfizierten Zecken unter Berücksichtigung des Entwicklungsstadiums sowie der Borrelien-, Rickettsien- und Babesienpezies sind im Anhang in der Originalarbeit 10 zu finden, die zur Publikation eingereicht ist (Hildebrandt et al., 2011c, *Supplemental Figure S1*: OA10 - S. 6).

Vogelassozierte Zecken

Koinfektionen vogelassoziierter Zecken sind bisher kaum bekannt. Eine Studie aus Russland fand in 5 von 8 *Anaplasma* spp.-infizierten *I. ricinus* Zecken eine Mischinfektion mit Borrelien (Alekseev et al., 2001). Unsere Arbeit weist erstmals ein breites Spektrum an Koinfektionen in vogelassozierten *I. ricinus* Zecken nach (Hildebrandt et al., 2010c; 2011a; Franke et al., 2010a, c). In 15,2% (16/105) der positiven Zecken fanden wir mehrere Erreger (Abb. 8, Seite 48). Diese Zecken stammten von 11 Vögeln 5 verschiedener Vogelarten (*Turdus merula*, *Turdus iliacus*, *Erithacus rubecula*, *Turdus philomelos* und *Parus major*). Auf der Greifswalder Oie waren 6 (3,1%) Zecken koinfiziert; d.h. 5% (5/99) der

Vögel trugen mehrfach-infizierte Zecken (Hildebrandt et al., 2010c; Franke et al., 2010c). In Reifenstein konnten wir in 10 Zecken (5,3%) Mehrfachinfektionen an insgesamt 16,4% (10/61) der untersuchten Vögel nachweisen (Hildebrandt et al., 2011a; Franke et al., 2010a).

Eine Mischinfektion verschiedener Borrelienspezies trat in 5 Zecken auf. Eine Amsel war sogar mit einer Larve infestiert, die eine 3-fach-Kombination der Borrelienspezies *B. valaisiana* Subtyp I, *B. garinii* OspA-Typ 6 und Typ 8 aufwies (Abb. 8, Seite 48). Dies bestätigt die hohe Reservoirkompetenz der Vögel für LB-Erreger, da der untersuchte Vogel vermutlich mit allen 3 Spezies infiziert war und diese auf die Larve übertragen konnte.

Mehr als 1/3 der Amseln trug entweder koinfizierte Zecken oder mehrere mit verschiedenen Erregern infizierte Zecken. Auffallend war eine besonders stark infestierete Amsel (11 Larven, 9 Nymphen), die Kontakt mit allen 4 Erregern hatte. In den 20 parasitierenden Zecken dieser Amsel fanden wir folgende Infektionen und Koinfektionen:

- *B. valaisiana* Subtyp II (1 Nymphe),
- *A. phagocytophilum* (1 Nymphe),
- *R. monacensis* (1 Nymphe),
- *R. helvetica* (1 Nymphe),
- *A. phagocytophilum/Babesia divergens* (1 Larve) und
- *Borrelia bavariensis/R. monacensis* (1 Nymphe).

Bislang gibt es keine vergleichbaren Studien zu Koinfektionen vogelassoziierter Zecken. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Vogelarten zumindest in der Verbreitung einer Vielzahl von Erregern beteiligt sind, die sowohl in verschiedenen nebeneinander saugenden Zecken als auch innerhalb einer parasitierenden Zecke in verschiedenen Kombinationen existieren können.

Kleinsäugerassozierte Zecken

Unsere Arbeit beschreibt erstmals Koinfektionen kleinsäugerassoziierter Zecken (Hildebrandt et al., 2011a; Franke et al., 2010a). Nur 2 (0,7%) parasitierende Zecken waren koinfiziert. Dabei traten die folgenden Kombination auf: *A. phagocytophilum/Babesia divergens* (in einer Larve, die an einer Gelbhalsmaus saugte) und *Borrelia burgdorferi/Babesia* spp. (in einer an einer Rötelmaus parasitierenden Nymphe) (Abb. 8).

Anaplasma phagocytophilum ist nicht transovariell übertragbar, so dass die koinfizierte Larve den Erreger vermutlich von der Maus aufgenommen hatte.

Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass Kleinsäuger ein kleineres Spektrum zeckenassoziierter Pathogene übertragen als Vögel. Diese Schlußfolgerung steht im Einklang mit Untersuchungen aus der Slowakei, die weder in Gewebeproben noch in an Kleinsäufern gesogenen Larven Koinfektionen nachwiesen (Spitalska et al., 2008). Štefančíková et al. (2008) konnten in 1,8% der Ohrbiopate von Kleinsäufern Anaplasmen- und Borrelien-spezifische DNA finden. Die in unserer Arbeit untersuchten Ohrbiopate waren hingegen in der PCR alle negativ. In nur wenigen Studien traten in Organen verschiedener Nagerspezies 2- oder 3-fach-Infektionen der Erreger *Borrelia* spp., *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. und *F. tularensis* auf (Výrosteková et al., 2002; Christova und Gladnishka, 2005; Zhan et al., 2009). Für die Beurteilung der Bedeutung von Koinfektionen in Kleinsäufern und kleinsäugerassozierten Zecken sind weitere Studien erforderlich, um mögliche Interaktionen verschiedener Erreger und die potentielle Gefahr der Übertragung auf den Menschen zu verstehen.

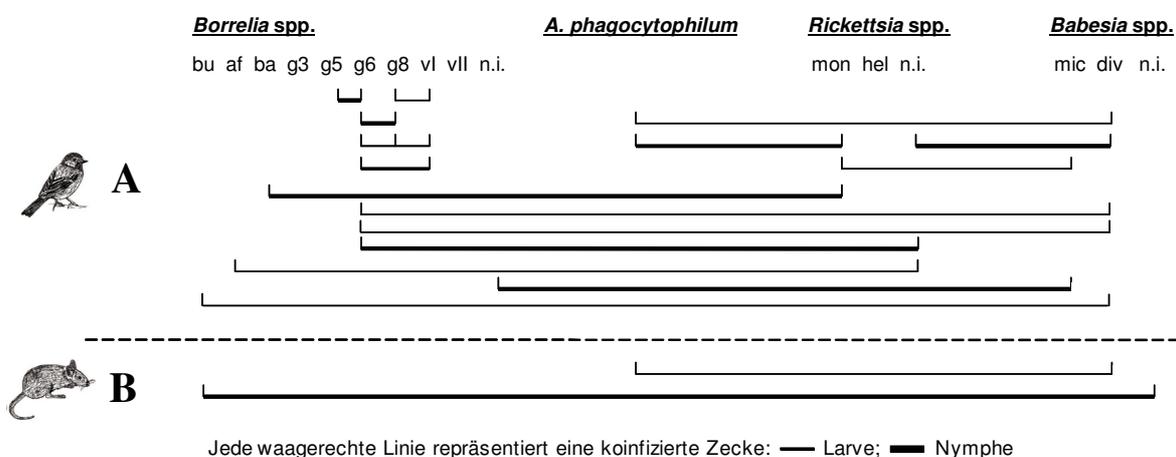


Abb. 8: Koinfektionen in vogel- und kleinsäugerassozierten Zecken

Herkunft der Zecken: A - vogelassozierte Zecken der Gebiete Greifswalder Oie und Reifenstein;

B - kleinsäugerassozierte Zecken des Gebietes Reifenstein

Borrelia spp.: bu - *B. burgdorferi*; af - *B. afzelii*; ba - *B. bavariensis*; g3, g5, g6 und g8 - *B. garinii* OspA-Typ 3, 5, 6 und 8; vl und II - *B. valaisiana* Subtyp I und II; n.i. - *Borrelia* spp.

Rickettsia spp.: mon - *R. monacensis*; hel - *R. helvetica*; n.i. - *Rickettsia* spp.

Babesia spp.: mic - *B. microti*; div - *B. divergens*; n.i. - *Babesia* spp.

Die dieser Abbildung zugrunde liegende Daten sind den Publikationen Hildebrandt et al, 2010c; 2011a; Franke et al., 2010a, c zu entnehmen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In wirtssuchenden *I. ricinus* Zecken ist ein sehr breites Spektrum an Borrelien-Genospezies und OspA-Typen zu finden, deren Zirkulation bei der Weiterentwicklung diagnostischer Tests und möglicher Impfungen für Europa Berücksichtigung finden sollte. Eine Kombination verschiedener Oberflächenantigene, sowie eine Immunisierung mit Zecken-spezifischen Proteinen wie einem Speichelprotein oder einem mit den Borrelien interagierendem Protein sind als Targets einer Impfung in der Diskussion (Schuijt et al., 2011).

Anaplasma phagocytophilum ist ein Erreger mit einer fokalen Verbreitung und noch unklarer Pathogenität in Europa. Innerhalb der SFG-Rickettsien war *R. helvetica* in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen aus Deutschland die dominierende Spezies in Freilandzecken, wobei *R. monacensis*, *R. felis*, *R. slovaca* und *R. massiliae* ebenfalls vereinzelt auftreten (Dobler und Wölfel, 2009). Die Infektionsrate für *Babesia* spp. variiert lokal sehr stark (Blaschitz et al., 2008b: 51% bis 100%). *Babesia microti* und *B. divergens* traten in unserer Arbeit gleichermaßen in wirtssuchenden Zecken auf, so dass humane Infektionen mit Erregern beider Spezieskomplexe in den Untersuchungsgebieten möglich sind. Auch die Unterscheidung der in Europa häufigen *B. divergens*-ähnlichen Spezies *B. venatorum* (EU1) gewinnt an Bedeutung. Deren Identität als eigene Spezies ist allerdings noch nicht abschließend geklärt (Herwaldt et al., 2003; Lempereur et al., 2011). Zudem gelang der Nachweis der selten in *I. ricinus* vorkommenden Erreger *C. burnetii* und *F. tularensis*. Die in unseren Untersuchungen erstmals beschriebenen Koinfektionen von *C. burnetii* mit einem breiten Spektrum anderer zeckenübertragener Erreger sowie neuen 3-fach Kombinationen führt zu der Annahme, dass Erregergruppen in einer noch unbekanntem Weise im Transmissionszyklus interagieren.

Bodenbewohnende Vogelarten tragen aufgrund ihrer verstärkten Zeckenexposition ein höheres Infestationsrisiko als z.B. baumbewohnende Spezies oder Seevögel. Der überwiegende Anteil der vogelassoziierten Zecken unserer Untersuchungen bestand aus Nymphen (68,9%), woraus eine wichtige Rolle der Vögel als Wirt für dieses Zeckenstadium ableitbar ist. Selbst bei nicht vorhandener Reservoirkompetenz können verschiedene Vogelarten infizierte Zecken über weite Distanzen transportieren und sind daher an der Verbreitung zahlreicher Erreger wie *Borrelia* spp., *A. phagocytophilum*, SFG-Rickettsien, *Babesia* spp. und auch *F. tularensis* beteiligt. So gelangen z.B. *R. monacensis*-infizierte Zecken mit Zugvögeln aus dem Mittelmeerraum nach Nordeuropa (Elfving et al., 2010). Der Nachweis

der kleinsäugerassoziierten Spezies *Borrelia afzelii* und *Borrelia bavariensis* in vogelassoziierten Zecken, darunter auch in Larven, widerspricht der beschriebenen strengen Assoziation der Genospezies mit einem bestimmten Wirtsorganismus (Kurtenbach et al., 1998a, 2002a).

Die Vogelarten Zilpzalp, Kohlmeise, Mönchsgrasmücke, Zaunkönig und Heckenbraunelle gehören zu den 20 häufigsten Brutvogelarten in Deutschland (Sudfeldt et al., 2008), waren aber deutlich seltener mit Zecken infestiert als Drosselarten (*Turdus* spp.). Unter ihnen scheint die Amsel (*Turdus merula*) eine besondere Rolle im Transmissionszyklus der untersuchten Erreger zu spielen. Diese Vogelart war signifikant häufiger mit koinfizierten Zecken infestiert; oftmals saugten hier mit verschiedenen Erregern infizierte Zecken an einem Wirt.

Die beiden untersuchten Kleinsäugerarten *Apodemus flavicollis* und *Myodes glareolus* bilden den Hauptanteil der Kleinsäugerfauna in den Waldgebieten Mitteleuropas (Kotlik et al., 2006; Siński et al., 2006a). Kleinsäuger bewegen sich v.a. in der unteren Krautschicht, woraus sich die überwiegende Infestation mit *I. ricinus* Larven erklärt. Ihr Bewegungsradius ist wesentlich geringer als der von Vögeln, weshalb sie auch weniger zur Verbreitung von Erregern beitragen. Die relativ hohen Borrelien-Infektionsraten in Kleinsäufern früherer Untersuchungen, die den IFT als Nachweismethode verwendeten (Humair et al., 1993; Gern et al., 1994), lassen sich in Studien mit Einsatz molekularbiologischer Techniken nicht reproduzieren (Kurtenbach et al., 1998b). Auch die Borrelien-Prävalenz in kleinsäugerassoziierten Zecken war in Untersuchungen unter Verwendung des IFT höher (Humair et al., 1993; Michalik et al., 2003) als in molekularbiologischen Nachweisverfahren (Franke, 2005; Siński et al., 2006a).

Die in unseren Untersuchungen geringe Infestationsrate der Nager mit Borrelien-infizierten Zecken und das enge Spektrum an Genospezies (*B. afzelii*, *B. burgdorferi*) stützen die Aussage, dass Kleinsäuger eine geringere Reservoirkompetenz für Borrelien besitzen als bislang angenommen. Für *A. phagocytophilum* sprechen die beobachtete relativ kurze Bakteriämie und verschiedene immunologische Vorgänge dafür, dass nicht alle Kleinnagerspezies in gleicher Weise als Reservoir geeignet sind (Bown et al., 2003; Beugnet und Marie, 2009). Bislang existieren nur wenige Studien zum Vorkommen von SFG-Rickettsien, *Babesia* spp. und *F. tularensis* in kleinsäugerassoziierten Zecken, so dass die Bedeutung der Kleinnager im Transmissionszyklus dieser Erregergruppen noch nicht vollends verstanden ist.

In den an Vögeln und Kleinsäugetieren parasitierenden Zecken lässt sich die Möglichkeit von *co-feeding* für viele der Borrelien-, *A. phagocytophilum*-, und Rickettsien-Infektionen nicht ausschließen. Für Babesien ist dieser Übertragungsweg hingegen aufgrund des komplexen Entwicklungszyklus des Erregers als unwahrscheinlich einzustufen. Einige Pathogene (*R. helvetica*, *Babesia divergens*, *F. tularensis*) sind transovariell übertragbar, so dass infizierte Larven die Infektion nicht zwingend von ihrem Wirt aufgenommen haben. Der Nachweis nicht transovariell übertragbarer Erreger (*Borrelia* spp., *A. phagocytophilum*, *Babesia microti*) in parasitierenden Larven stützt die Vermutung, dass Vögel oder Kleinsäugetiere eine entsprechende Reservoirkompetenz besitzen. Um diese These zu bestätigen, sind allerdings weitere xenodiagnostische Untersuchungen erforderlich.

Unsere Arbeit stellt erstmalig die Prävalenz und Koexistenz einer Vielzahl zeckenassoziierter Erreger in wirtssuchenden und parasitierenden *I. ricinus* Zecken in diesem Umfang dar. Sie erweitert den Kenntnisstand über die Bedeutung verschiedener Zeckenwirte im Transmissionszyklus der einzelnen Pathogene. Die untersuchten Vogel- und Kleinsäugetierarten kommen in vielen Teilen Europas vor, so dass ähnliche Ergebnisse auch in anderen Regionen zu erwarten sind. Die systematische Untersuchung einer Zeckenpopulation und potentieller Erreger-Reservoirs eignet sich daher als epidemiologisches Mittel, um die Bedeutung eines bestimmten infektiösen Agens und das Risiko der Infektion für den Menschen zu evaluieren. Die unvorhersehbaren Klimaveränderungen mit der Erweiterung des Verbreitungsgebietes von *I. ricinus* und anderer Zeckenarten, aber auch ein verändertes Freizeitverhalten der Menschen mit häufigem Aufenthalt in der Natur und im Ausland erfordern ein globales Netzwerk der Überwachung zeckenassoziierter Pathogene.

6. Literatur

- Adelson ME, Rao RV, Tilton RC, Cabets K, Eskow E, Fein L, Occi JL, Mordechai E.** 2004. Prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Bartonella* spp., *Babesia microti*, and *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes scapularis* ticks collected in Northern New Jersey. *J Clin Microbiol*, 42:2799-2801.
- Afzelius A.** 1921. Erythema chronicum migrans. *Acta Derm Venereol*, 2:120-125.
- Alekseev AN, Dubinina HV, Semenov AV, Bolshakov CV.** 2001. Evidence of ehrlichiosis agents found in ticks (Acari: Ixodidae) collected from migratory birds. *J Med Entomol*, 38:471-474.
- Armstrong PM, Katavolos P, Caporale DA, Smith RP, Spielman A, Telford 3rd SR.** 1998. Diversity of *Babesia* infecting deer ticks (*Ixodes dammini*). *Am J Trop Med Hyg*, 58:739-742.
- Babes V.** 1888. Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. *Compt Rend Acad Sci Ser III Sci Vie*, 107:692-694.
- Bakken JS, Dumler JS, Chen SM, Eckman MR, Van Etta LL, Walker DH.** 1994. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? *JAMA*, 272:212-218.
- Bakken JS, Dumler JS.** 2000. Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis*, 31:554-560.
- Barandika JF, Hurtado A, Garcia-Sanmartin J, Juste RA, Anda P, Garcia-Perez AL.** 2008. Prevalence of tick-borne zoonotic bacteria in questing adult ticks from northern Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 8:829-835.
- Beck R, Vojta L, Curković S, Mrljak V, Margaletić J, Habrun B.** 2011. Molecular survey of *Babesia microti* in wild rodents in Central Croatia. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11:81-83.
- Becker CA, Bouju-Albert A, Jouglin M, Chauvin A, Malandrin L.** 2009. Natural transmission of zoonotic *Babesia* spp. by *Ixodes ricinus* ticks. *Emerg Infect Dis*, 15:320-322.
- Belongia EA.** 2002. Epidemiology and impact of coinfections acquired from *Ixodes* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2:265-273.
- Benach JL, Coleman JL, Habicht GS, MacDonald A, Grunwaldt E, Giron JA.** 1985. Serological evidence for simultaneous occurrences of Lyme disease and babesiosis. *J Infect Dis*, 152:473-477.
- Bertolotti L, Tomassone L, Tramuta C, Grego E, Amore G, Ambrogi C, Nebbia P, Mannelli A.** 2006. *Borrelia lusitaniae* and spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Tuscany, central Italy. *J Med Entomol*, 43:159-165.
- Beugnet F, Marie JL.** 2009. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet Parasitol*, 163:298-305.
- Bjoersdorff A, Bergstrom S, Massung RF, Haemig PD, Olsen B.** 2001. *Ehrlichia*-infected ticks on migrating birds. *Emerg Infect Dis*, 7:877-879.
- Blaschitz M, Narodoslavsky-Gföller M, Kanzler M, Walochnik J, Stanek G.** 2008a. First detection of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in Austria. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 8:561-563.
- Blaschitz M, Narodoslavsky-Gföller M, Kanzler M, Stanek G, Walochnik J.** 2008b. *Babesia* species occurring in Austrian *Ixodes ricinus* ticks. *Appl Environ Microbiol*, 74:4841-4846.
- Bonnet S, Jouglin M, L'Hostis M, Chauvin A.** 2007. *Babesia* sp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*. *Emerg Infect Dis*, 13:1208-1210.
- Bonnet S, Brisseau N, Hermouet A, Jouglin M, Chauvin A.** 2009. Experimental in vitro transmission of *Babesia* sp. (EU1) by *Ixodes ricinus*. *Vet Res*, 40:21.
- Boretti FS, Perreten A, Meli ML, Cattori V, Willi B, Wengi N, Hornok S, Honegger H, Hegglin D, Woelfel R, Reusch CE, Lutz H, Hofmann-Lehmann R.** 2009. Molecular Investigations of *Rickettsia helvetica* infection in dogs, foxes, humans, and *Ixodes* ticks. *Appl Environ Microbiol*, 75:3230-3237.
- Bown KJ, Begon M, Bennett M, Woldehiwet Z, Ogden NH.** 2003. Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*, 9:63-70.

- Bown KJ, Lambin X, Telford GR, Ogden NH, Telfer S, Woldehiwet Z, Birtles RJ.** 2008. Relative importance of *Ixodes ricinus* and *Ixodes trianguliceps* as vectors for *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in field vole (*Microtus agrestis*) populations. *Appl Environ Microbiol*, 74:7118-7125.
- Brezina R, Rehacek J.** 1961. A study of the phase variations phenomenon by experimental infection of the tick *Dermacentor marginatus* (Sulzer) with *Coxiella burnetii*. *Acta Virol*, 5:250-254.
- Brouqui P, Parola P, Fournier PE, Raoult D.** 2007. Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 49:2-12.
- Burgdorfer W, Friedhoff KT, Lancaster JL Jr.** 1966. Natural history of tick-borne spotted fever in the USA. Susceptibility of small mammals to virulent *Rickettsia rickettsii*. *Bull World Health Organ*, 35:149-153.
- Burgdorfer W, Aeschlimann A, Peter O, Hayes SF, Philip RN.** 1979. *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. *Acta Trop*, 36:357-367.
- Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP.** 1982. Lyme disease - a tick-borne spirochetosis? *Science*, 216:1317-1319.
- Casati S, Sager H, Gern L, Piffaretti JC.** 2006. Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Ann Agric Environ Med*, 13:65-70.
- Casey AN, Birtles RJ, Radford AD, Bown KJ, French NP, Woldehiwet Z, Ogden NH.** 2004. Groupings of highly similar major surface protein (p44)-encoding paralogues: a potential index of genetic diversity amongst isolates of *Anaplasma phagocytophilum*. *Microbiology*, 150:727-734.
- Casjens SR, Fraser-Liggett CM, Mongodin EF, Qiu WG, Dunn JJ, Luft BJ, Schutzer SE.** 2011. Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate. *J Bacteriol*, 193:1489-1490.
- Caturegli P, Asanovich KM, Walls JJ, Bakken JS, Madigan JE, Popov VL, Dumler JS.** 2000. *anka*: an *Ehrlichia phagocytophila* group gene encoding a cytoplasmatic protein antigen with ankyrin repeats. *Infect Immun*, 68: 5277-5283.
- Cekanac R, Pavlovic N, Gledovic Z, Grgurevic A, Stajkovic N, Lepsanovic Z, Ristanovic E.** 2010. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in Belgrade area. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 10:447-452.
- Chae JS, Foley JE, Dumler JS, Madigan JE.** 2000. Comparison of the nucleotide sequences of 16S rRNA, 444 *Ep-ank* and *groESL* heat shock operon genes in naturally occurring *Ehrlichia equi* and human granulocytic Ehrlichiosis agent isolates from Northern California. *J Clin Microbiol*, 38:1364-1369.
- Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH.** 1994. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol*, 32:589-595.
- Chochlak D, Ioannou I, Kokkini I, Tselentis Y, Psaroulaki A.** 2009. Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in a high-risk human population. *J Infect*, 58:87-88.
- Christova I, Gladnishka T.** 2005. Prevalence of infection with *Francisella tularensis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in rodents from an endemic focus of tularemia in Bulgaria. *Ann Agric Environ Med*, 12:149-152.
- Cieniuch S, Stańczak J, Ruczaj A.** 2009. The first detection of *Babesia* EU1 and *Babesia canis canis* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) collected in urban and rural areas in northern Poland. *Pol J Microbiol*, 58:231-236.
- Cinco M, Padovan D, Murgia R, Maroli M, Frusteri L, Heldtander M, Johansson KE, Engvall EO.** 1997. Coexistence of *Ehrlichia phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Italy as determined by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol*, 35:3365-3366.
- Cinco M, Luzzati R, Mascioli M, Floris R, Brouqui P.** 2006. Serological evidence of *Rickettsia* infections in forestry rangers in north-eastern Italy. *Clin Microbiol Infect*, 12:493-495.
- Clifford CM, Sonenshine DE, Atwood EL, Robbins CS, Hughes LE.** 1969. Tests on ticks from wild birds collected in the eastern United States for rickettsiae and viruses. *Am J Trop Med Hyg*, 18:1057-1061.
- Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I, Kurtenbach K, Schafer SM, Vitorino L, Goncalves L, Baptista S, Vieira ML, Cunha C.** 2004. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J Clin Microbiol*, 42:1316-1318.

- Comstedt P, Bergstrom S, Olsen B, Garpmo U, Marjavaara L, Mejlon H, Barbour AG, Bunikis J.** 2006. Migratory passerine birds as reservoirs of Lyme borreliosis in Europe. *Emerg Infect Dis*, 12:1087-1095.
- Cotté V, Bonnet S, Le Rhun D, Le Naour E, Chauvin A, Boulouis HJ, Lecuelle B, Lilin T, Vayssier-Taussat M.** 2008. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerg Infect Dis*, 14:1074-1080.
- Cotté V, Bonnet S, Cote M, Vayssier-Taussat M.** 2010. Prevalence of five pathogenic agents in questing *Ixodes ricinus* ticks from Western France. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 10:723-730.
- Dautel H, Dippel C, Kämmer D, Werkhausen A, Kahl O.** 2008. Winter activity of *Ixodes ricinus* in a Berlin forest. *Int J Med Microbiol*, 298 (Suppl 1):50-54.
- de la Fuente J, Ruiz-Fons F, Naranjo V, Torina A, Rodriguez O, Gortazar C.** 2008. Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. *Res Vet Sci*, 84:382-386.
- Derdáková M, Halanová M, Stanko M, Štefančíková A, Čisláková L, Peťko B.** 2003. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from eastern Slovakia. *Ann Agric Environ Med*, 10:269-271.
- Derrick EH.** 1937. "Q" fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. *Med J Aust*, 2:281-299.
- Dietrich F, Schmidgen T, Maggi RG, Richter D, Matuschka FR, Vonthein R, Breitschwerdt EB, Kempf VA.** 2010. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Appl Environ Microbiol*, 76:1395-1398.
- Dobler G, Wölfel R.** 2009. Typhus and other rickettsioses: emerging infections in Germany. *Dtsch Arztebl Int*, 106:348-354.
- Doudier B, Olano J, Parola P, Brouqui P.** 2010. Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* spp. as human pathogens. *Vet Parasitol*, 167:149-154.
- Dubska L, Literak I, Kocianova E, Taragel'ová V, Sychra O.** 2009. Differential role of passerine birds in distribution of *Borrelia* spirochetes, based on data from ticks collected from birds during the postbreeding migration period in Central Europe. *Appl Environ Microbiol*, 75:596-602.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR.** 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51:2145-2165.
- Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, Grab DJ, Bakken JS.** 2005. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg Infect Dis*, 11:1828-1834.
- Eiffert H, Ohlenbusch A, Christen HJ, Thomssen R, Spielman A, Matuschka FR.** 1995. Nondifferentiation between Lyme disease spirochetes from vector ticks and human cerebrospinal fluid. *J Infect Dis*, 171:476-479.
- Eisen L, Lane RS.** 2002. Vectors of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. In: Gray J, Kahl O, Lane RS, Stanek G (Hrsg) *Lyme Borreliosis Biology, Epidemiology and Control*, CABI Publishing, New York:91-115.
- Elfving K, Lindblom A, Nilsson K.** 2008. Seroprevalence of *Rickettsia* spp. infection among tick-bitten patients and blood donors in Sweden. *Scand J Infect Dis*, 40:74-77.
- Elfving K, Olsen B, Bergstrom S, Waldenstrom J, Lundkvist A, Sjostedt A, Mejlon H, Nilsson K.** 2010. Dissemination of spotted fever rickettsia agents in Europe by migrating birds. *PLoS ONE*, 5:e8572. doi:10.1371/journal.pone.0008572
- Fingerle V, Goodman JL, Johnson RC, Kurtti TJ, Munderloh UG, Wilske B.** 1997. Human granulocytic ehrlichiosis in southern Germany: increased seroprevalence in high-risk groups. *J Clin Microbiol*, 35:3244-3247.
- Fingerle V, Munderloh UG, Liegl G, Wilske B.** 1999. Coexistence of ehrlichiae of the *phagocytophila* group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. *Med Microbiol Immunol*, 188:145-149.
- Fingerle V, Schulte-Spechtel UC, Ruzic-Sabljić E, Leonhard S, Hofmann H, Weber K, Pfister K, Strle F, Wilske B.** 2008. Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int J Med Microbiol*, 298:279-290.
- Foley JE, Nieto NC, Adjemian J, Dabritz H, Brown RN.** 2008. *Anaplasma phagocytophilum* infection in small mammal hosts of *Ixodes* ticks, western United States. *Emerg Infect Dis*, 14:1147-1150.

- Foppa IM, Krause PJ, Spielman A, Goethert H, Gern L, Brand B, Telford 3rd SR.** 2002. Entomologic and serologic evidence of zoonotic transmission of *Babesia microti*, eastern Switzerland. *Emerg Infect Dis*, 8:722-726.
- Fournier PE, Grunnenberger F, Jaulhac B, Gastinger G, Raoult D.** 2000. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. *Emerg Infect Dis*, 6:389-392.
- Francis E.** 1919. Deer-fly fever, or pahvant valley plague. A disease of man of hitherto unknown etiology. *Public Health Rep*, 34:2061-2062.
- Franke J.** 2005. Anwendung etablierter Methoden bei der Untersuchung saisonaler Unterschiede in der Transmission von *Borrelia burgdorferi* sensu lato - Genospezies durch Kleinsäuger. Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Franke J.** 2010. Zur Bedeutung des Vektors *Ixodes ricinus* und verschiedener Wirtsspezies für die Verbreitung zeckenassoziierter Krankheitserreger. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Franke J, Fritsch J, Tomaso H, Straube E, Dorn W, Hildebrandt A.** 2010a. Co-existence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat of Central Germany. *Appl Environ Microbiol*, 76:6829-6836.
- Franke J, Moldenhauer A, Hildebrandt A, Dorn W.** 2010b. Are birds reservoir hosts for *Borrelia afzelii*? *Ticks Tick-borne Dis*, 1:109-112.
- Franke J, Meier F, Moldenhauer A, Straube E, Dorn W, Hildebrandt A.** 2010c. Established and emerging pathogens in *Ixodes ricinus* ticks collected from birds on a conservation island in the Baltic Sea. *Med Vet Entomol*, 24:425-432.
- Franke J, Hildebrandt A, Meier F, Straube E, Dorn W.** 2011. Prevalence of Lyme disease agents and several emerging pathogens in questing ticks from the German Baltic coast. *J Med Entomol*, 48:441-444.
- Freitag M, Müller I, Poggensee G, Scharnetzky E, Hunfeld KP.** 2010. German investigation on Lyme Borreliosis: Evaluation of therapeutic and diagnostic cost (GILEAD) – a quality control project. *Proceedings of the 12th International Conference on Lyme Borreliosis and other Tick-Borne Diseases*:page 25.
- Gern L, Siegenthaler M, Hu CM, Leuba-Garcia S, Humair PF, Moret J.** 1994. *Borrelia burgdorferi* in rodents (*Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*): duration and enhancement of infectivity for *Ixodes ricinus* ticks. *Eur J Epidemiol*, 10:75-80.
- Gern L, Rais O.** 1996. Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*, 33:189-192.
- Gern L, Hu CM, Voet P, Hauser P, Lobet Y.** 1997. Immunization with a polyvalent OspA vaccine protects mice against *Ixodes ricinus* tick bites infected by *Borrelia burgdorferi* s.s., *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii*. *Vaccine*, 15:1551-1557.
- Gern L.** 2009. Life cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and transmission to humans. *Curr Probl Dermatol*, 37:18-30.
- Gilbert L.** 2009. Altitudinal patterns of tick and host abundance: a potential role for climate change in regulating tick-borne diseases? *Oecologia*, 162:217-225.
- Goethert HK, Telford 3rd SR.** 2003. What is *Babesia microti*? *Parasitology*, 127:301-309.
- Graham RI, Mainwaring MC, Du Feu R.** 2010. Detection of spotted fever group *Rickettsia* spp. from bird ticks in the U.K. *Med Vet Entomol*, 24:340-343.
- Gray JS.** 1984. Studies on the dynamics of active populations of the sheep tick *Ixodes ricinus* L. in Co. Wicklow, Ireland. *Acarologia*, 25:167-178.
- Gray JS.** 1991. The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme Borreliosis. *Rev Med Vet Entomol*, 79: 323-333.
- Gray JS, Pudney M.** 1999. Activity of atovaquone against *Babesia microti* in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *J Parasitol*, 85:723-728.
- Gray JS, Kirstein F, Robertson JN, Stein J, Kahl O.** 1999. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and rodents in a recreational park in south-western Ireland. *Exp Appl Acarol*, 23:717-729.
- Gray JS, von Stedingk LV, Gurtelschmid M, Granstrom M.** 2002. Transmission studies of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks and gerbils. *J Clin Microbiol*, 40:1259-1263.

- Gray JS. 2006. Identity of the causal agents of human babesiosis in Europe. *Int J Med Microbiol*, 296 (Suppl 40):131-136.
- Gray JS, Weiss LM. 2008. *Babesia microti*. In: Khan N (Hrsg) Emerging protozoan pathogens, Taylor and Francis, Abingdon, UK:303-349.
- Gray JS, Dautel H, Estrada-Pena A, Kahl O, Lindgren E. 2009. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2009:593232. doi:10.1155/2009/593232
- Gray JS, Zintl A, Hildebrandt A, Hunfeld KP, Weiss L. 2010. Zoonotic babesiosis: Overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. *Ticks Tick-borne Dis*, 1:3-10.
- Grzeszczuk A, Stańczak J. 2006. Highly variable year-to-year prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in northeastern Poland: a 4-year follow-up. *Ann N Y Acad Sci*, 1078:309-311.
- Gubernot DM, Nakhasi HL, Mied PA, Asher DM, Epstein JS, Kumar S. 2009. Transfusion-transmitted babesiosis in the United States: summary of a workshop. *Transfusion*, 49:2759-2771.
- Gurycová D, Kocianová E, Výrosteková V, Reháček J. 1995. Prevalence of ticks infected with *Francisella tularensis* in natural foci of tularemia in western Slovakia. *Eur J Epidemiol*, 11:469-474.
- Gurycová D. 1998. First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe. *Eur J Epidemiol*, 14:797-802.
- Gurycová D, Výrosteková V, Khanakah G, Kocianová E, Stanek G. 2001. Importance of surveillance of tularemia natural foci in the known endemic area of Central Europe, 1991-1997. *Wien Klin Wochenschr*, 113:433-438.
- Haapasalo K, Suomalainen P, Sukura A, Siikamaki H, Jokiranta TS. 2010. Fatal babesiosis in man, Finland, 2004. *Emerg Infect Dis*, 16:1116-1118.
- Halos L, Jamal T, Maillard R, Beugnet F, Le Menach A, Boulouis HJ, Vayssier-Taussat M. 2005. Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* sp. *Vet Res*, 36:79-87.
- Halos L, Bord S, Cotté V, Gasqui P, Abrial D, Barnouin J, Boulouis HJ, Vayssier-Taussat M, Vourc'h G. 2010. Ecological factors characterizing the prevalence of bacterial tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in pastures and woodlands. *Appl Environ Microbiol*, 76:4413-4420.
- Hanincová K, Taragel'ová V, Koci J, Schafer SM, Hails R, Ullmann AJ, Piesman J, Labuda M, Kurtenbach K. 2003a. Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. *Appl Environ Microbiol*, 69:2825-2830.
- Hanincová K, Schafer SM, Etti S, Sewell HS, Taragel'ová V, Ziak D, Labuda M, Kurtenbach K. 2003b. Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. *Parasitology*, 126:11-20.
- Häselbarth K, Tenter AM, Brade V, Krieger G, Hunfeld KP. 2007. First case of human babesiosis in Germany – Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. *Int J Med Microbiol*, 297:197-204.
- Hartelt K, Oehme R, Frank H, Brockmann SO, Hassler D, Kimmig P. 2004. Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. *Int J Med Microbiol*, 293 (Suppl 37):86-92.
- Hartelt K, Pluta S, Oehme R, Kimmig P. 2008. Spread of ticks and tick-borne diseases in Germany due to global warming. *Parasitol Res*, 103 (Suppl 1):109-116.
- Hellenbrand W, Breuer T, Petersen L. 2001. Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999. *Emerg Infect Dis*, 7:789-796.
- Hengel R, Kausche GA, Sheris E. 1950. Über zwei dörfliche Q-Fieberepidemien in Baden. *Dtsch Med Wochenschr*, 45:1505-1507.
- Hercík K, Hášová V, Janecek J, Branny P. 2007. Molecular evidence of *Bartonella* DNA in ixodid ticks in Czechia. *Folia Microbiol (Praha)*, 52:503-509.
- Herwaldt BL, Caccio S, Gherlinzoni F, Aspöck H, Slemenda SB, Piccaluga P, Martinelli G, Edelhofer R, Hollenstein U, Poletti G, Pampiglione S, Loschenberger K, Tura S, Pieniasek NJ. 2003. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg Infect Dis*, 9:942-948.

- Hildebrandt A, Schmidt KH, Fingerle V, Wilske B, Straube E.** 2002. Prevalence of granulocytic *Ehrlichiae* in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany (Thuringia) detected by PCR and sequencing of a 16S ribosomal DNA fragment. *FEMS Microbiology Letters*, 211:225-230.
- Hildebrandt A, Schmidt KH, Wilske B, Dorn W, Straube E, Fingerle V.** 2003. Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and coinfection with *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes ricinus* ticks in central Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 22:364-367.
- Hildebrandt A, Hunfeld KP, Baier M, Krumbholz A, Sachse S, Lorenzen T, Kiehntopf M, Fricke HJ, Straube E.** 2007. First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 26:595-601.
- Hildebrandt A, Tenter AM, Straube E, Hunfeld KP.** 2008. Human babesiosis in Germany: just overlooked or truly new? *Int J Med Microbiol*, (Suppl 1):336-346.
- Hildebrandt A, Pauliks K, Sachse S, Straube E.** 2010a. Coexistence of *Borrelia* spp. and *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 10:831-837.
- Hildebrandt A, Krämer A, Sachse S, Straube E.** 2010b. Detection of *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia). *Ticks Tick-borne Dis*, 1:52-56.
- Hildebrandt A, Franke J, Meier F, Sachse S, Dorn W, Straube E.** 2010c. The role of migratory birds in transmission cycles of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. *Ticks Tick-borne Dis*, 1:105-107.
- Hildebrandt A, Fritsch J, Franke J, Sachse S, Dorn W, Straube E.** 2011a. Co-circulation of emerging tick-borne pathogens in Middle Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11:533-537.
- Hildebrandt A, Straube E, Neubauer H, Schmoock G.** 2011b. *Coxiella burnetii* in *Ixodes ricinus* ticks, Germany. 2010. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11:1205-1207.
- Hildebrandt A, Franke J, Schmoock G, Pauliks K, Krämer A, Straube E.** 2011c. Diversity and co-existence of tick-borne pathogens in Central Germany. *J Med Entomol*, 48: 651-655.
- Holden K, Boothby JT, Kasten RW, Chomel BB.** 2006. Co-detection of *Bartonella henselae*, *Borrelia burgdorferi*, and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes pacificus* ticks from California, USA. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 6:99-102.
- Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford 3rd SR, Krause PJ, Persing DH.** 2000. Babesiosis. *Clin Microbiol Rev*, 13:451-469.
- Hopla CE.** 1953. Experimental studies on tick transmission of tularemia organisms. *Amer J Hyg*, 58:101-118.
- Hu CM, Wilske B, Fingerle V, Lobet Y, Gern L.** 2001. Transmission of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 to BALB/c mice by *Ixodes ricinus* ticks collected in the field. *J Clin Microbiol*, 39:1169-1171.
- Hu CM, Cheminade Y, Perret JL, Weynants V, Lobet Y, Gern L.** 2003. Early detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in Balb/c mice by co-feeding *Ixodes ricinus* ticks. *Int J Med Microbiol*, 293:421-426.
- Hubálek Z, Juricová Z, Halouzka J.** 1990. *Francisella tularensis* from ixodid ticks in Czechoslovakia. *Folia Parasitol (Praha)*, 37:255-260.
- Hubálek Z, Halouzka J.** 1998. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitol Res*, 84:167-172.
- Huegli D, Hu CM, Humair PF, Wilske B, Gern L.** 2002. *Apodemus* species mice are reservoir hosts of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 in Switzerland. *J Clin Microbiol*, 40:4735-4737.
- Humair PF, Turrian N, Aeschliemann A, Gern L.** 1993. *Borrelia burgdorferi* in a focus of Lyme borreliosis: epizootiologic contribution of small mammals. *Folia Parasitologica*, 40:65-70.
- Hummler SB.** 2001. Auswertung diagnostischer Verfahren bei Borrelienerkrankung. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- Hunfeld KP, Lambert A, Kampen H, Albert S, Epe C, Brade V, Tenter AM.** 2002. Seroprevalence of *Babesia* infections in humans exposed to ticks in midwestern Germany. *J Clin Microbiol*, 40:2431-2436.
- Hunfeld KP, Hildebrandt A, Gray JS.** 2008. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *Int J Parasitol*, 38:1219-1237.

- Inokuma H, Brouqui P, Drancourt M, Raoult D.** 2001. Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*. *J Clin Microbiol*, 39:3031-3039.
- Ioannou I, Chochlakis D, Kasinis N, Anayiotos P, Lyssandrou A, Papadopoulos B, Tselentis Y, Psaroulaki A.** 2009. Carriage of *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii* and *Anaplasma* spp. by endemic and migratory wild birds and their ectoparasites in Cyprus. *Clin Microbiol Infect*, 15 (Suppl 2):158-160.
- Jado I, Oteo JA, Aldamiz M, Gil H, Escudero R, Ibarra V, Portu J, Portillo A, Lezaun MJ, Garcia-Amil C, Rodriguez-Moreno I, Anda P.** 2007. *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. *Emerg Infect Dis*, 13:1405-1407.
- Jansen A, La Scola B, Raoult D, Lierz M, Wichmann O, Stark K, Schneider T.** 2008. Antibodies against *Rickettsia* spp. in hunters, Germany. *Emerg Infect Dis*, 14:1961-1963.
- Jenkins A, Kristiansen BE, Allum AG, Aakre RK, Strand L, Kleveland EJ, van de Pol I, Schouls L.** 2001. *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia* spp. in *Ixodes ticks* from southern Norway. *J Clin Microbiol*, 39:3666-3671.
- Jouda F, Crippa M, Perret JL, Gern L.** 2003. Distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks of canton Ticino (Switzerland). *Eur J Epidemiol*, 18:907-912.
- Kantsø B, Svendsen CB, Moestrup Jensen P, Vennestrøm J, Krogfelt KA.** 2010. Seasonal and habitat variation in the prevalence of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks from Denmark. *Ticks Tick-borne Dis*, 1:101-103.
- Kayser P, Seibold E, Matz-Rensing K, Pfeffer M, Essbauer S, Spletstoesser WD.** 2008. Re-emergence of tularemia in Germany: presence of *Francisella tularensis* in different rodent species in endemic areas. *BMC Infect Dis*, 8:157.
- Kipp S, Goedecke A, Dorn W, Wilske B, Fingerle V.** 2006. Role of birds in Thuringia, Germany, in the natural cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the Lyme disease spirochaete. *Int J Med Microbiol*, 296 (Suppl 1):125-128.
- Kipp S.** 2008. Wirt-Vektor-Beziehungen und genetische Heterogenität von *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Borreliose Naturherden. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Klee SR, Tyczka J, Ellerbrok H, Franz T, Linke S, Baljer G, Appel B.** 2006. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiol*, 6:2.
- Korenberg EI.** 2004. Problems in the study and prophylaxis of mixed infections transmitted by ixodid ticks. *Int J Med Microbiol*, 293 (Suppl 37):80-85.
- Kotlik P, Deffontaine V, Mascheretti S, Zima J, Michaux JR, Searle JB.** 2006. A northern glacial refugium for bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:14860-14864.
- Kramptitz HE.** 1979. *Babesia microti*: morphology, distribution and host relationship in Germany. *Zentralbl Bakteriolog Orig A*, 244:411-415.
- Kramer M.** 1990. Epizootologisch-epidemiologische Untersuchungsprogramme von potentiellen Naturherdinfektionen am Beispiel des Q-Fiebers im Bezirk Suhl [dissertation]. Leipzig, Germany: Karl-Marx-Universität.
- Kramer M.** 1991. Zum Vorkommen, zur Verbreitung und zur Epidemiologie des Q-Fiebers in den neuen Bundesländern der Bundesrepublik Deutschland. *Tierärztl Umschau*, 46:411-416.
- Krause PJ, Telford 3rd SR, Pollack RJ, Ryan R, Brassard P, Zemel L, Spielman A.** 1992. Babesiosis: an underdiagnosed disease of children. *Pediatrics*, 89:1045-1048.
- Krause PJ, Telford 3rd SR, Spielman A, Sikand V, Ryan R, Christianson D, Burke G, Brassard P, Pollack R, Peck J, Persing DH.** 1996. Concurrent Lyme disease and babesiosis. Evidence for increased severity and duration of illness. *JAMA*, 275:1657-1660.
- Krause PJ, Spielman A, Telford 3rd SR, Sikand VK, McKay K, Christianson D, Pollack RJ, Brassard P, Magera J, Ryan R, Persing DH.** 1998. Persistent parasitemia after acute babesiosis. *N Eng J Med*, 339:160-165.
- Krause PJ, McKay K, Thompson CA, Sikand VK, Lentz R, Lepore T, Closter L, Christianson D, Telford 3rd SR, Persing D, Radolf JD, Spielman A.** 2002. Disease-specific diagnosis of coinfecting tickborne zoonoses: babesiosis, human granulocytic ehrlichiosis, and Lyme disease. *Clin Infect Dis*, 34:1184-1191.

- Krause PJ, Gewurz BE, Hill D, Marty FM, Vannier E, Foppa IM, Furman RR, Neuhaus E, Skowron G, Gupta S, McCalla C, Pesanti EL, Young M, Heiman D, Hsue G, Gelfand JA, Wormser GP, Dickason J, Bia FJ, Hartman B, Telford 3rd SR, Christianson D, Dardick K, Coleman M, Girotto JE, Spielman A. 2008. Persistent and relapsing babesiosis in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*, 46:370-376.
- Kurtenbach K, Dizij A, Seitz HM, Margos G, Moter SE, Kramer MD, Wallich R, Schaible UE, Simon MM. 1994. Differential immune responses to *Borrelia burgdorferi* in European wild rodent species influence spirochete transmission to *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae). *Infect Immun*, 62:5344-5352.
- Kurtenbach K, Sewell H-S, Ogden NH, Randolph SE, Nuttall PA. 1998a. Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. *Infect Immun*, 66:1248-1251.
- Kurtenbach K, Peacey M, Rijpkema SGT, Hoodless N, Nuttall PA, Randolph SE. 1998b. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Appl Environ Microbiol*, 64:1169-1174.
- Kurtenbach K, De Michelis S, Sewell H-S, Etti S, Schafer SM, Hails R, Collares-Pereira M, Santos-Reis M, Hanincová K, Labuda M, Bormane A, Donaghy M. 2001. Distinct combinations of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies found in individual questing ticks from Europe. *Appl Environ Microbiol*, 67:4926-4929.
- Kurtenbach K, Schäfer SM, de Michaelis S, Etti S, Sewell HS. 2002a. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the vertebrate host. In: Gray J, Kahl O, Lane RS, Stanek G (Hrsg) Lyme Borreliosis Biology, Epidemiology and Control, *CABI Publishing*, New York:117-148.
- Kurtenbach K, De Michelis S, Etti S, Schafer SM, Sewell HS, Brade V, Kraiczky P. 2002b. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato - the key role of host complement. *Trends Microbiol*, 10:74-79.
- Kuzynski MC, Caporale DA. 2010. *Borrelia caporalei* sp. nov., a proposed new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from north central United States. *Proceedings of the 12th International Conference on Lyme Borreliosis and other Tick-Borne Diseases*:page 39.
- Ladbury GA, Stuen S, Thomas R, Bown KJ, Woldehiwet Z, Granquist EG, Bergstrom K, Birtles RJ. 2008. Dynamic transmission of numerous *Anaplasma phagocytophilum* genotypes among lambs in an infected sheep flock in an area of anaplasmosis endemicity. *J Clin Microbiol*, 46:1686-1691.
- Lange S, Klaus G. 1992. Seroepidemiologische Untersuchungen zum Nachweis von Q-Fieber bei Schafen in Mittel-Thüringen. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*, 105:333-335.
- Leiby DA. 2006. Babesiosis and blood transfusion: flying under the radar. *Vox Sang*, 90:157-165.
- Lempereur L, De Cat A, Caron Y, Madder M, Claerebout E, Saegerman C, Losson B. 2011. First molecular evidence of potentially zoonotic *Babesia microti* and *Babesia* sp. EU1 in *Ixodes ricinus* ticks in Belgium. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11:125-130.
- Lenčáková D, Hizo-Teufel C, Pet'ko B, Schulte-Spechtel U, Stanko M, Wilske B, Fingerle V. 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. OspA-Types in *Ixodes ricinus* ticks from selected localities in Slovakia and Poland. *Int J Med Microbiol*, 296 (Suppl 40):108-118.
- Levin ML, Fish D. 2000b. Immunity reduces reservoir host competence of *Peromyscus leucopus* for *Ehrlichia phagocytophila*. *Infect Immun*, 68:1514-1518.
- Liebisch A. 1977. Das Q-Fieber als Naturherdinfektion in Süddeutschland. *Bundesgesundheitsblatt*, 20:185-191.
- Liebisch A. 1991. Biologie und Ökologie der Zecken. In: Horst H (Hrsg) Einheimische Zeckenborreliose (Lyme Krankheit) bei Mensch und Tier, 1. Auflage, Perimed-spitta, Nürnberg:31-47.
- Lipkin WI. 2010. Microbe hunting. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74:363-377.
- Liz JS, Anderes L, Sumner JW, Massung RF, Gern L, Rutti B, Brossard M. 2000. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J Clin Microbiol*, 38:1002-1007.
- Liz JS, Sumner JW, Pfister K, Brossard M. 2002. PCR detection and serological evidence of granulocytic ehrlichial infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*). *J Clin Microbiol*, 40:892-897.

- Ljunggren MK, Johnsson P, Wilhelmsson P, Broddegard K, Lindblom P, Fryland L, Lindvall L, Åkesson MA, Ekerfelt C, Ernerudh J, Forsberg P, Lindgren PE. 2010. Detection and quantification of *Anaplasma phagocytophilum* in ticks detached from humans in Sweden. Proceedings of the 12th International Conference on Lyme Borreliosis and other Tick-Borne Diseases:page 30.
- Majerská M, Brezina R. 1968. The relationship between *Coxiella burnetii* and ticks. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol, 12:162-167.
- Majlathová V, Majlath I, Derdákóvá M, Vichova B, Pet'ko B. 2006. *Borrelia lusitaniae* and green lizards (*Lacerta viridis*), Karst Region, Slovakia. Emerg Infect Dis, 12:1895-1901.
- Margos G, Gatewood AG, Aanensen DM, Hanincová K, Terekhova D, Vollmer SA, Cornet M, Piesman J, Donaghy M, Bormane A, Hurn MA, Feil EJ, Fish D, Casjens S, Wormser GP, Schwartz I, Kurtenbach K. 2008. MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. Proc Natl Acad Sci U S A, 105, 8730-8735.
- Margos G, Vollmer SA, Cornet M, Garnier M, Fingerle V, Wilske B, Bormane A, Vitorino L, Collares-Pereira M, Drancourt M, Kurtenbach K. 2009. MLSA on housekeeping genes defines a new *Borrelia* species. Appl Environ Microbiol, 75 5410-5416.
- Margos G, Hojgaard A, Lane RS, Cornet M, Fingerle V, Rudenko N, Ogden N, Aanensen DM, Fish D, Piesman J. 2010. Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. Ticks Tick-borne Dis, 1:151-158.
- Márquez FJ, Muniain MA, Soriguer RC, Izquierdo G, Rodríguez-Baño J, Borobio MV. 1998. Genotypic identification of an undescribed spotted fever group rickettsia in *Ixodes ricinus* from southwestern Spain. Am J Trop Med Hyg, 58:570-577.
- Martinot M, Zadeh MM, Hansmann Y, Grawey I, Christmann D, Aguilon S, Jouglin M, Chauvin A, De Briel D. 2011. Babesiosis in immunocompetent patients, Europe. Emerg Infect Dis, 17:114-116.
- Massung RF, Owens JH, Ross D, Reed KD, Petrovec M, Bjoersdorff A, Coughlin RT, Beltz GA, Murphy CI. 2000. Sequence analysis of the *ank* gene of granulocytic Ehrlichiae. J Clin Microbiol, 38:2917-2922.
- Materna J, Daniel M, Danielova V. 2005. Altitudinal distribution limit of the tick *Ixodes ricinus* shifted considerably towards higher altitudes in central Europe: results of three years monitoring in the Krkonose Mts. (Czech Republic). Cent Eur J Public Health, 13:24-28.
- Matuschka FR, Fischer P, Heiler M, Blumcke S, Spielman A. 1992. Stage-associated risk of transmission of the Lyme disease spirochete by European *Ixodes* ticks. Parasitol Res, 78:695-698.
- Maurin M, Raoult D. 1999. Q fever. Clin Microbiol Rev, 12:518-553.
- McCoy GW. 1911. A plague-like disease of rodents. Publ. Health Bull, 45:53-71.
- Meer-Scherrer L, Adelson M, Mordechai E, Lottaz B, Tilton R. 2004. *Babesia microti* infection in Europe. Curr Microbiol, 48:435-437.
- Menardi G, Floris R, Mignozzi K, Boemo B, Altobelli A, Cinco M. 2008. Detection and genotyping of *Borrelia burgdorferi* in the trans-border area between Italy and Slovenia and evaluation of co-infection with *Anaplasma phagocytophilum* in ticks. Int J Med Microbiol, 298 (Suppl 1):121-124.
- Michalik J, Hofman T, Buczek A, Skoracki M, Sikora B. 2003. *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks collected from vegetation and small rodents in recreational areas of the city of Poznań. J Med Entomol, 40:690-697.
- Michel H, Wilske B, Hettche G, Gottner G, Heimerl C, Reischl U, Schulte-Spechtel U, Fingerle V. 2003. An *ospA*-polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism based method for sensitive detection and reliable differentiation of all European *Borrelia burgdorferi* sensu lato species and *OspA*-Types. Med Microbiol Immunol, 193:219-226.
- Milhano N, Lopes de Carvalho I, Alves AS, Arrube S, Soares J, Rodriguez P, Carolino M, Nuncio MS, Piesman J, de Sousa R. 2010. Coinfections of *Rickettsia slovacica* and *Rickettsia helvetica* with *Borrelia lusitaniae* in ticks collected in a Safari Park, Portugal. Ticks Tick-borne Dis, 1:172-177.
- Milutinović M, Masuzawa T, Tomanović S, Radulović Z, Fukui T, Okamoto Y. 2008. *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* and their co-infections in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks collected in Serbia. Exp Appl Acarol, 45:171-183.
- Montgomery RR, Malawista SE. 1994. *Borrelia burgdorferi* and the macrophage: routine annihilation but occasional haven? Parasitol Today, 10:154-157.

- Mörner T, Mattsson R.** 1988. Experimental infection of five species of raptors and of hooded crows with *Francisella tularensis* biovar palaeartica. *J Wildl Dis*, 24:15-21.
- Mörner T.** 1992. The ecology of tularaemia. *Rev Sci Tech*, 11:1123-1130.
- Movila A, Dubinina HV, Tolstenkov OO, Toderas I, Alekseev AN.** 2011. Detection of *Babesia* sp. EU1 and members of spotted fever group rickettsiae in ticks collected from migratory birds at Curonian Spit, North-Western Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11:89-91.
- Nadelman RB, Horowitz HW, Hsieh TC, Wu JM, Aguero-Rosenfeld ME, Schwartz I, Nowakowski J, Varde S, Wormser GP.** 1997. Simultaneous human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis. *N Engl J Med*, 337:27-30.
- Nassal J.** 1982. Q-Fieber. Eine klassische Zoonose. *Tierärztliche Umschau*, 37:109-114.
- Nielsen H, Fournier PE, Pedersen IS, Krarup H, Ejlersen T, Raoult D.** 2004. Serological and molecular evidence of *Rickettsia helvetica* in Denmark. *Scand J Infect Dis*, 36:559-563.
- Nilsson K, Lindquist O, Liu AJ, Jaenson TG, Friman G, Pahlson C.** 1999. *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in Sweden. *J Clin Microbiol*, 37:400-403.
- Ohlenbusch A, Matuschka FR, Richter D, Christen HJ, Thomssen R, Spielman A, Eiffert H.** 1996. Etiology of the acrodermatitis chronica atrophicans lesion in Lyme disease. *J Infect Dis*, 174:421-423.
- Oleson CV, Sivalingam JJ, O'Neill BJ, Staas WE Jr.** 2003. Transverse myelitis secondary to coexistent Lyme disease and babesiosis. *J Spinal Cord Med*, 26:168-171.
- Olsen B, Duffy DC, Jaenson TG, Gylfe A, Bonnedahl J, Bergstrom S.** 1995a. Transhemispheric exchange of Lyme disease spirochetes by seabirds. *J Clin Microbiol*, 33:3270-3274.
- Olsen B, Jaenson T, Bergstrom S.** 1995b. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. *Appl Environ Microbiol*, 61:3082-3087.
- Ornstein K, Petersson AC, Eliasson I.** 2010. Lyme arthritis in southern Scandinavia; four species identified in synovial fluid (*B. burgdorferi*, *B. afzelii*, *B. garinii* and *B. spielmanii*). Proceedings of the 12th International Conference on Lyme Borreliosis and other Tick-Borne Diseases:page 43.
- Parola P, Davoust B, Raoult D.** 2005a. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet Res*, 36:469-492.
- Parola P, Paddock CD, Raoult D.** 2005b. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev*, 18:719-756.
- Paulauskas A, Radzijeuskaja J, Rosef O.** 2009. *Anaplasma* in ticks feeding on migrating birds and questing ticks in Lithuania and Norway. *Clin Microbiol Infect* 15 (Suppl 2):34-36.
- Pawelczyk A, Siński E.** 2000. Prevalence of IgG antibodies response to *Borrelia burgdorferi* s.l. in populations of wild rodents from Mazury lakes district region of Poland. *Ann Agric Environ Med*, 7:79-83.
- Peirce MA.** 2000. A taxonomic review of avian piroplasms of the genus *Babesia* Starcovici, 1893 (Apicomplexa: Piroplasmorida: Babesiidae). *J Natural History*, 34:317-332.
- Peirce MA.** 2005. A checklist of the valid avian species of *Babesia* (Apicomplexa: Piroplasmorida), *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida), and *Hepatozoon* (Apicomplexa: Haemogregarinidae). *J Natural History*, 39:3621-3632.
- Persing DH, Mathiesen D, Marshall WF, Telford 3rd SR, Spielman A, Thomford JW, Conrad PA.** 1992. Detection of *Babesia microti* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 30:2097-2103.
- Petrovec M, Lotric-Furlan S, Zupanc TA, Strle F, Brouqui P, Roux V, Dumler JS.** 1997. Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *J Clin Microbiol*, 35:1556-1559.
- Piccolin G, Benedetti G, Doglioni C, Lorenzato C, Mancuso S, Papa N, Pitton L, Ramon MC, Zasio C, Bertiato G.** 2006. A study of the presence of *B. burgdorferi*, *Anaplasma* (previously *Ehrlichia*) *phagocytophilum*, *Rickettsia*, and *Babesia* in *Ixodes ricinus* collected within the territory of Belluno, Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 6:24-31.
- Pichon B, Egan D, Rogers M, Gray J.** 2003. Detection and identification of pathogens and host DNA in unfed host-seeking *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*, 40:723-731.

- Pichon B, Kahl O, Hammer B, Gray JS.** 2006. Pathogens and host DNA in *Ixodes ricinus* nymphal ticks from a German forest. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 6:382-387.
- Piesman J, Gern L.** 2004. Lyme borreliosis in Europe and North America. *Parasitology*, 129 (Suppl 1):191-220.
- Podsiadly E, Karbowski G, Tylewska-Wierzbanska S.** 2009. Presence of *Bartonella* spp. in Ixodidae ticks. *Clin Microbiol Infect*, 15 (Suppl 2):120-121.
- Poupon MA, Lommano E, Humair PF, Douet V, Rais O, Schaad M, Jenni L, Gern L.** 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Appl Environ Microbiol*, 72:976-979.
- Randolph SE, Gern L, Nuttall PA.** 1996. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol Today*, 12:472-479.
- Randolph SE.** 2001. The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356:1045-1056.
- Raoult D, Roux V.** 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, 10:694-719.
- Rauter C, Hartung T.** 2005. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl Environ Microbiol*, 71:7203-7216.
- Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD.** 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol*, 173:1576-1589.
- Reháček J, Brezina, R.** 1973. Public health and veterinary importance of rickettsiosis in Slovakia. 1. Int. Arbeitskonferenz über "Naturherde von Infektionskrankheiten in Zentraleuropa" Graz, Biologisches Forschungsinstitut, Burgenland:69-79.
- Reháček J, Krauss H, Kocianová E, Kováčová E, Hinterberger G, Hanák P, Tůma V.** 1993. Studies of the prevalence of *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, in the foothills of the southern Bavarian Forest, Germany. *Zentralbl Bacteriol*, 278:132-138.
- Reháček J, Kaaserer B, Urvölgyi J, Lukáčová M, Kováčová E, Kocianová E.** 1994. Isolation of *Coxiella burnetii* and of an unknown rickettsial organism from *Ixodes ricinus* ticks collected in Austria. *Eur J Epidemiol*, 10:719-723.
- Reye AL, Hübschen JM, Saussy A, Muller CP.** 2010. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Appl Environ Microbiol*, 76:2923-2931.
- Richter D, Matuschka FR.** 2006. Perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia lusitaniae* by lizards. *Appl Environ Microbiol*, 72:4627-4632.
- Ricketts H.** 1909. Some aspects of Rocky Mountain spotted fever as shown by recent investigations. *Med Rec*, 16:843-855.
- RKI.** 2010: SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat>, Datenstand: 07.04.2010.
- Roux V, Rydkina E, Ereemeeva M, Raoult D.** 1997. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol*, 47:252-261.
- Rudenko N, Golovchenko M, Mokráček A, Piskunová N, Ruzek D, Mallatová N, Grubhoffer L.** 2008. Detection of *Borrelia bissettii* in cardiac valve tissue of a patient with endocarditis and aortic valve stenosis in the Czech Republic. *J Clin Microbiol*, 46:3540-3543.
- Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH Jr.** 2011. *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated from rodents and tick from the southeastern United States. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61:381-383.
- Sanogo YO, Zeaiter Z, Caruso G, Merola F, Shpynov S, Brouqui P, Raoult D.** 2003. *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodida) removed from humans, Belluno province, Italy. *Emerg Infect Dis*, 9:329-332.
- Santos-Silva MM, Sousa R, Santos AS, Melo P, Encarnacao V, Bacellar F.** 2006. Ticks parasitizing wild birds in Portugal: detection of *Rickettsia aeschlimannii*, *R. helvetica* and *R. massiliae*. *Exp Appl Acarol*, 39:331-338.
- Schaaf J.** 1961. Query-Fieber des Rindes. *Monatsheft für Tierheilkunde*, 13:1-18.
- Schex S, Dobler G, Riehm J, Müller J, Essbauer S.** 2011. *Rickettsia* spp. in wild small mammals in lower Bavaria, South-Eastern Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11:493-502.

- Schuijt TJ, Hovius JW, van der Poll T, van Dam AP, Fikrig E. 2011. Lyme borreliosis vaccination: the facts, the challenge and the future. *Trends Parasitol*, 27:40-47.
- Silaghi C, Gilles J, Hohle M, Fingerle V, Just FT, Pfister K. 2008a. *Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany. *Emerg Infect Dis*, 14:972-974.
- Silaghi C, Gilles J, Hohle M, Pradel I, Just FT, Fingerle V, Kuchenhoff H, Pfister K. 2008b. Prevalence of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in southern Germany. *J Med Entomol*, 45:948-955.
- Siński E, Pawełczyk A, Bajer A, Behnke J. 2006a. Abundance of wild rodents, ticks and environmental risk of Lyme borreliosis: a longitudinal study in an area of Mazury Lakes district of Poland. *Ann Agric Environ Med*, 13:295-300.
- Siński E, Bajer A, Welc R, Pawełczyk A, Ogrzewalska M, Behnke JM. 2006b. *Babesia microti*: Prevalence in wild rodents and *Ixodes ricinus* ticks from the Mazury Lakes District of northeastern Poland. *Int J Med Microbiol*, 296 (Suppl 1):137-143.
- Skarphedinsson S, Lyholm BF, Ljungberg M, Sogaard P, Kolmos HJ, Nielsen LP. 2007. Detection and identification of *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia helvetica* in Danish *Ixodes ricinus* ticks. *Apmis*, 115:225-230.
- Skotarczak B, Cichočka A. 2001. Isolation and amplification by polymerase chain reaction DNA of *Babesia microti* and *Babesia divergens* in ticks in Poland. *Ann Agric Environ Med*, 8:187-189.
- Skotarczak B, Rymaszewska A, Wodecka B, Sawczuk M. 2003. Molecular evidence of coinfection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, human granulocytic ehrlichiosis agent, and *Babesia microti* in ticks from northwestern Poland. *J Parasitol*, 89:194-196.
- Skotarczak B, Rymaszewska A, Wodecka B, Sawczuk M, Adamska M, Maciejewska A. 2006. PCR detection of granulocytic *Anaplasma* and *Babesia* in *Ixodes ricinus* ticks and birds in west-central Poland. *Ann Agric Environ Med*, 13:21-23.
- Skrabalo Z, Deanovic Z. 1957. Piroplasmosis in man; report of a case. *Doc Med Geogr Trop*, 9:11-16.
- Smetanová K, Schwarzová K, Kocianová E. 2006. Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., and *Borrelia burgdorferi* s. l. in ticks, and wild-living animals in western and middle Slovakia. *Ann N Y Acad Sci*, 1078:312-315.
- Sonenshine DE. 1992. *Biology of Ticks*. Vol 1. Oxford University Press, New York. 447 pages.
- Spielman A, Levine JF, Wilson ML. 1984. Vectorial capacity of North American *Ixodes* ticks. *Yale J Biol Med*, 57:507-513.
- Špitalská E, Kocianová E. 2002. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected in Slovakia and Hungary. *Eur J Epidemiol*, 18:263-266.
- Špitalská E, Literák I, Sparagano OA, Golovchenko M, Kocianová E. 2006. Ticks (Ixodidae) from passerine birds in the Carpathian region. *Wien Klin Wochenschr*, 118:759-764.
- Špitalská E, Boldiš V, Košťanová Z, Kocianová E, Štefanidesová K. 2008. Incidence of various tick-borne microorganisms in rodents and ticks of central Slovakia. *Acta Virol*, 52:175-179.
- Sprong H, Wielinga PR, Fonville M, Reusken C, Brandenburg AH, Borgsteede F, Gaasenbeek C, van der Giessen JW. 2009. *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. *Parasit Vectors*, 2:41.
- Stańczak J, Gabre RM, Kruminis-Lozowska W, Racewicz M, Kubica-Biernat B. 2004. *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. *Ann Agric Environ Med*, 11:109-114.
- Stańczak J, Racewicz M, Cieniuch S, Michalik J, Sikora B. 2009. Prevalence of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) paratizing small rodents. *Proceedings of the X. International Jena Symposium on Tick-borne Diseases in Weimar*:p 71.
- Stanek G. 2009. Büchse der Pandora: Krankheitserreger in *Ixodes ricinus*-Zecken in Mitteleuropa. *Wien Klin Wochenschr*, 121:673-683.
- Stanek G, Fingerle V, Hunfeld KP, Jaulhac B, Kaiser R, Krause A, Kristoferitsch W, O'Connell S, Ornstein K, Strle F, Gray J. 2011. Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect*, 17:69-79.
- Steere AC, Malawista SE, Hardin JA, Ruddy S, Askenase W, Andiman WA. 1977. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. *Ann Intern Med*, 86:685-698.

- Štefančíková A, Derdáková M, Lenčáková D, Ivanová R, Stanko M, Čisláková L, Pet'ko B. 2008. Serological and molecular detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasmataceae* in rodents. *Folia Microbiol (Praha)*, 53:493-499.
- Stern C, Kaiser A, Maier WA, Kampen H. 2006. Die Rolle von Amsel (*Turdus merula*), Rotdrossel (*Turdus iliacus*) und Singdrossel (*Turdus philomelos*) als Blutwirte für Zecken (Acari: Ixodidae) und Reservoirwirte für vier Genospezies des *Borrelia burgdorferi*-Artenkomplexes. *Mitt Dtsch Ges Allg Angew Ent*, 15:349-356.
- Sudfeldt C, Dröschmeister R, Flade M, Grüneberg C, Mitschke A, Schwarz J, Wahl J. 2009. Vögel in Deutschland – Hrsg: Dachverband Deutscher Avifaunisten (DDA), Bundesamt für Naturschutz (BfN) und Länderarbeitsgemeinschaft der Vogelschutzwarten (LAG VSW), Münster.
- Sumner JW, Nicholson WL, Massung RF. 1997. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock operon of *Ehrlichia* species. *J Clin Microbiol*, 35:2087-2092.
- Swanson SJ, Neitzel D, Reed KD, Belongia EA. 2006. Coinfections acquired from *Ixodes* ticks. *Clin Microbiol Rev*, 19:708-727.
- Tälleklint L, Jaenson TG. 1995. Is the small mammal (*Clethrionomys glareolus*) or the tick vector (*Ixodes ricinus*) the primary overwintering reservoir for the Lyme borreliosis spirochete in Sweden? *J Wildl Dis*, 31:537-540.
- Taragel'ová V, Kočí J, Hanincová K, Kurtenbach K, Derdáková M, Ogden NH, Literak I, Kocianová E, Labuda M. 2008. Blackbirds and song thrushes constitute a key reservoir of *Borrelia garinii*, the causative agent of borreliosis in Central Europe. *Appl Environ Microbiol*, 74:1289-1293.
- Telford 3rd SR, Wormser GP. 2010. *Bartonella* spp. transmission by ticks not established. *Emerg Infect Dis*, 16:379-384.
- Thomas V, Anguita J, Barthold SW, Fikrig E. 2001. Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis alters murine immune responses, pathogen burden, and severity of Lyme Arthritis. *Infect Immun*, 69:3359-3371.
- Thoms H-J. 1996. Epidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Coxiella burnetii* auf vier Truppenübungsplätzen der Bundeswehr in Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen [dissertation]. Giessen, Germany: Justus-Liebig-Universität Giessen.
- Uilenberg G. 2006. *Babesia* – a historical overview. *Vet Parasitol*, 138:3-10.
- Václav R, Ficová M, Prokop P, Betáková T. 2011. Associations between coinfection prevalence of *Borrelia lusitaniae*, *Anaplasma* sp., and *Rickettsia* sp. in hard ticks feeding on reptile hosts. *Microb Ecol*, 61:245-253.
- Vannier E, Krause PJ. 2009. Update on babesiosis. *Interdiscip Perspect Infect. Dis*, 2009:984568. doi:10.1155/2009/984568 984568.
- Versage JL, Severin DD, Chu MC, Petersen JM. 2003. Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *J Clin Microbiol*, 41:5492-5499.
- Vitorino L, Zé-Zé L, Sousa A, Bacellar F, Tenreiro R. 2003. rRNA intergenic spacer regions for phylogenetic analysis of *Rickettsia* species. *Ann N Y Acad Sci* 990:726-733.
- Výrosteková V. 1994. Transstadial transmission of *Francisella tularensis* by *Ixodes ricinus* ticks infected during the nymphal stage. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 43:166-170. (in Slovak.)
- Výrosteková V, Khanakah G, Kocianová E, Gurycová D, Stanek G. 2002. Prevalence of coinfection with *Francisella tularensis* in reservoir animals of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Wien Klin Wochenschr*, 114:482-488.
- Walter G, Weber G. 1981. A study on the transmission (transstadial, transovarial) of *Babesia microti*, strain 'Hannoveri', in its tick vector, *Ixodes ricinus*. *Tropenmed Parasitol*, 32:228-230. (in German).
- Wang G, van Dam AP, Schwartz I, Dankert J. 1999. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 12:633-653.
- Webb L, Carl M, Malloy DC, Dasch GA, Azad AF. 1990. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 28:530-534.
- Welc-Fałęciak R, Bajera A, Bednarska M, Paziewska A, Siński E. 2007. Long term monitoring of *Babesia microti* infection in BALB/c mice using nested PCR. *Ann Agric Environ Med*, 14:287-290.
- Welc-Fałęciak R, Bajera A, Behnke JM, Siński E. 2008. Effects of host diversity and the community composition of hard ticks (Ixodidae) on *Babesia microti* infection. *Int J Med Microbiol*, 298 (Suppl 1):235-242.

- Welc-Fałęciak R, Hildebrandt A, Siński E.** 2010. Co-infection with *Borrelia* species and other tick-borne pathogens in humans: two cases from Poland. *Ann Agric Environ Med*, 17:63-67.
- Weyer F.** 1975. Observations on the behaviour of *Coxiella burnetii* in the argasid tick *Ornithodoros moubata* (author's transl). *Tropenmed Parasitol*, 26:219-231.
- Wicki R, Sauter P, Mettler C, Natsch A, Enzler T, Pusterla N, Kuhnert P, Egli G, Bernasconi M, Lienhard R, Lutz H, Leutenegger CM.** 2000. Swiss Army survey in Switzerland to determine the prevalence of *Francisella tularensis*, members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and tick-borne encephalitis virus in ticks. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 19:427-432.
- Wielinga PR, Fonville M, Sprong H, Gaasenbeek C, Borgsteede F, van der Giessen JWB.** 2009. Persistent detection of *Babesia* EU1 and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* in the Netherlands during a 5-year surveillance: 2003-2007. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 9:119-121.
- Wilske B, Busch U, Fingerle V, Jauris-Heipke S, Preac-Mursic V, Rössler D, Will G.** 1996a. Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for *Borrelia* vaccine development. *Infection*, 24:208-212.
- Wilske B, Busch U, Eiffert H, Fingerle V, Pfister HW, Rössler D, Preac-Mursic V.** 1996b. Diversity of OspA and OspC among cerebrospinal fluid isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from patients with neuroborreliosis in Germany. *Med Microbiol Immunol*, 184:195-201.
- Wilske B, Zöller L, Brade V, Eiffert M, Göbel UB, Stanek G, unter Mitarbeit von Pfister HW.** 2000. MIQ 12, Lyme-Borreliose. In: Mauch, H., Lütticken, R., Gattermann, S. (Eds.), *Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik*. Urban & Fischer, München-Jena, 59pp. (in German).
- Woessner R, Gaertner BC, Grauer MT, Weber K, Mueller-Lantzsch N, Hunfeld KP, Treib J.** 2001. Incidence and prevalence of infection with human granulocytic ehrlichiosis agent in Germany. A prospective study in young healthy subjects. *Infection*, 29:271-273.
- Wójcik-Fatla A, Szymańska J, Wdowiak L, Buczek A, Dutkiewicz J.** 2009. Coincidence of three pathogens (*Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti*) in *Ixodes ricinus* ticks in the Lublin macroregion. *Ann Agric Environ Med*, 16:151-158.
- Wölfel R, Terzioglu R, Kiessling J, Wilhelm S, Essbauer S, Pfeffer M, Dobler G.** 2006. *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Bavaria, Germany. *Ann N Y Acad Sci*, 1078:509-511.
- Wormser GP, Dattwyler RJ, Shapiro ED, Halperin JJ, Steere AC, Klempner MS, Krause PJ, Bakken JS, Strle F, Stanek G, Bockenstedt L, Fish D, Dumler JS, Nadelman RB.** 2006. The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 43:1089-1134.
- Wright SA, Thompson MA, Miller MJ, Knerl KM, Elms SL, Karpowicz JC, Young JF, Kramer VL.** 2000. Ecology of *Borrelia burgdorferi* in ticks (Acari: Ixodidae), rodents, and birds in the Sierra Nevada foothills, Placer County, California. *J Med Entomol*, 37:909-918.
- Zhan L, Cao WC, Chu CY, Jiang BG, Zhang F, Liu W, Dumler JS, Wu XM, Zuo SQ, Zhang PH, Huang HN, Zhao QM, Jia N, Yang H, Richardus JH, Habbema JD.** 2009. Tick-borne agents in rodents, China, 2004-2006. *Emerg Infect Dis*, 15:1904-1908.
- Zhan L, Cao WC, Jiang JF, Zhang XA, Wu XM, Zhang WY, Liu W, Zuo SQ, Cao ZW, Yang H, Richardus JH, Habbema JD.** 2010. *Anaplasma phagocytophilum* in livestock and small rodents. *Vet Microbiol*, 144:405-408.
- Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, Taylor SM, Gray JS.** 2003. *Babesia divergens*, bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clin Rev Microbiol*, 16:622-636.

7. Danksagung

Ohne die Unterstützung von Kollegen, Freunden und meiner Familie wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. Eberhard Straube für die Möglichkeit, das Thema der zeckenübertragenen Erreger am Institut zu etablieren und die großzügige Förderung meiner Arbeit. Durch sein persönliches Engagement, die Aufgeschlossenheit gegenüber neuen Ideen, das entgegengebrachte Vertrauen sowie die Unterstützung der Publikationen hat er meinen wissenschaftlichen und auch persönlichen Werdegang wesentlich geprägt.

Für das gemeinsame Forschen, die hilfreiche Kritik und auch die schönen Momente im Labor bedanke ich mich herzlichst bei: PD Dr. Karl-Hermann Schmidt, Gisela Gaschler, Svea Sachse, Daniela Hoffmann, Prof. Dr. Wolfgang Pfister, PD Dr. Andi Krumbholz und Dr. Michael Baier. Allen nicht namentlich aufgeführten Kolleginnen und Kollegen unseres Institutes danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit.

Dr. Andreas Goedecke vom ProRing e.V. und den Mitgliedern des Jordsand e.V. danke ich für die Bereitstellung der vogelassozierten Zecken.

Prof. Dr. Klaus-Peter Hunfeld gilt mein herzlicher Dank für die sehr angenehme und bereichernde Zusammenarbeit, die mir neue Möglichkeiten im wissenschaftlichen Denken und Handeln aufgezeigt hat.

Herrn Dr. Gernot Schmooch und PD Dr. Herbert Tomaso vom Friedrich-Löffler Institut in Jena sowie Herrn Dr. Wolf Splettstößer vom Konsiliarlabor für Tularämie in München gilt mein Dank für die Möglichkeit, die Untersuchungen um selten in *I. ricinus* nachgewiesene Erreger zu erweitern.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Jan Franke und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfram Dorn für die ausgezeichnete und unkomplizierte Zusammenarbeit, die Anregungen sowie die jederzeit sehr wertvollen Diskussionen bedanken.

Meiner Hand voll engen Freunden danke ich dafür, dass sie mir in jeder Situation zur Seite gestanden haben. Aus den Freundschaften vom Karate-, Lauf- oder Schwimmtraining konnte ich sehr viel Kraft und Selbstvertrauen für das wissenschaftliche Arbeiten gewinnen. Ganz besonders danke ich meiner Freundin Maria Breternitz-Grühne, deren Freundschaft bereits seit vielen Jahren für mich eine Bereicherung in allen Lebenslagen darstellt.

Dr. Christian Lucas hat mich durch seine Anteilnahme, die mit großer Motivation und Freude angefertigten Zeichnungen, seine ausstrahlende Ruhe und belebenden Humor beim Anfertigen der Arbeit in besonderer Weise begleitet. Ich möchte ihm an dieser Stelle für die Geduld und Liebe danken, die auch die Distanz zwischen Jena und Münster überwunden hat.

Meinen Eltern gilt ein ganz besonderer und schwer verbalisierbarer Dank. Sie haben stets meine Interessen gefördert und mir dadurch meinen Werdegang ermöglicht. Ich empfinde tiefe Dankbarkeit dafür, dass sie meinen Lebensweg so unermüdlich und ausdauernd mit ausgestreckten Armen begleiten.

Ihnen und Euch allen: DANKE.

8. Anlagen

Lebenslauf

Dr. Anke Hildebrandt

05.07.1978	geboren in Gotha
1985 - 1997	Grundschule und Gymnasium, Gotha
Juni 1997	Abitur
Okt. 1997 - Mai 2004	Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Mai 2004	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	Promotion zum Dr. med. an der FSU Jena zum Thema: Prävalenz von Ehrlichien der <i>Ehrlichia phagocytophila</i> Genogruppe und Borrelien des <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato Komplexes in <i>Ixodes ricinus</i> Zecken aus dem Ilmtal
Aug 2004 - Juli 2005	Assistenzärztin im Fachbereich Innere Medizin, Paracelsus-Spital Richterswil (Schweiz)
Okt 2005 - Dez 2010	Ärztin im Fachbereich Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena
17.09. - 14.12.2007	Diplom für Tropenmedizin und Hygiene (DTM&H) an der Liverpool School of Tropical Medicine & Hygiene (UK)
November 2009	Facharztbezeichnung Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Infektionsepidemiologie
seit Feb 2011	Assistenzärztin im Fachbereich Innere Medizin, St. Vincenz Krankenhaus Datteln

Gutachtertätigkeit für wissenschaftliche Zeitschriften: International Journal of Medical Microbiology, Ticks and Tick-borne Diseases, Vector-Borne and Zoonotic Diseases, Journal of Medical Microbiology

Jena, aktualisiert im Dezember 2011

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass mir die Habilitationsordnung der Friedrich-Schiller-Universität Jena vom 07.01.1997 bekannt ist.

Ferner erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Prof. Dr. Eberhard Straube (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Jena): Konzeption und Auswertung der Laborarbeiten
2. Dr. Jan Franke (Institut für Ernährungswissenschaften): Sammeln der Zecken, DNA-Extraktion aus den Untersuchungsgebieten Greifswalder Oie und Reifenstein, Auswertung der Ergebnisse
3. Dr. Andreas Goedecke (ProRing e.V.): Sammeln vogelassoziierter Zecken
4. Matthias Mütze (ehem. Jordsand e.V.): Sammeln vogelassoziierter Zecken
5. Dipl. biol. Svea Sachse (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Jena): Klonierung der Positivkontrollen, Sequenzierung positiver PCR-Produkte, molekularbiologische Auswertung der Ergebnisse
6. Prof. Dr. Klaus-Peter Hunfeld (Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin, Krankenhaus Nordwest, Frankfurt/Main): Durchführung der Babesien-Serologie
7. Dr. Gernot Schmoock (Friedrich-Löffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Standort Jena): Durchführung der *Coxiella burnetii*-Untersuchungen
8. PD Dr. Herbert Tomaso (Friedrich-Löffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Standort Jena): Durchführung der *Francisella tularensis*-Untersuchungen
9. Dr. Wolf Splettstößer (Konsiliarlabor für Tularämie, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München): Durchführung der *Francisella tularensis*-Untersuchungen

10. Dr. Volker Fingerle (Nationales Referenzzentrum für Borrelien, Oberschleißheim): Bereitstellung verschiedener Borrelien-Referenzstämme
11. Prof. Dr. Ute Mackenstedt (Universität Hohenheim, Fachbereich Parasitologie, Stuttgart): Bereitstellung der *Babesia microti* und *Babesia divergens* Positivkontrollen
12. Prof. Dr. Ulrike Munderloh (College of Agriculture, University of Minnesota, USA): Bereitstellung der *Anaplasma phagocytophilum* und *Rickettsia* spp. Positivkontrollen
13. In der Arbeitsgruppe eingebundene Doktoranden: Katharina Pauliks, Angela Krämer, Julia Fritzsch, Frank Meier.
14. Daniela Hoffmann (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Jena): technische Assistenz
15. Dr. Christian Lucas (Rechtsanwalt, Münster): Zeichnungen

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Jena, 06. Dezember 2010

Die Originalarbeiten OA1 bis OA14 sind aus urheberrechtlichen Gründen in der elektronischen Fassung nicht enthalten.