

Aus dem Department für Pathobiologie  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Parasitologie  
(Leiterin: Univ.Prof. Dr.med.vet. Anja Joachim)

**Zecken und von Zecken übertragene Krankheitserreger im Umfeld von  
Militärhunden in Kaisersteinbruch**

Bachelorarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Doris Fasching

Wien, im Juni 2020

Betreuer: Priv.-Doz. Dr. Hans-Peter Führer

Institut für Parasitologie

Department für Pathobiologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

Begutachterin: Dr.<sup>in</sup> Sabine Hammer

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Zecken</b>	<b>8</b>
3.1.	<i>Biologie, Entwicklung und Lebensraum</i>	8
3.2.	<i>Ixodes ricinus</i>	11
3.3.	<i>Ixodes inopinatus</i>	11
3.4.	<i>Dermacentor reticulatus</i>	12
3.5.	<i>Haemaphysalis concinna</i>	13
3.6.	<i>Haemaphysalis inermis</i>	14
<b>4</b>	<b>Pathogene</b>	<b>15</b>
4.1.	<i>Bakterien</i>	15
4.1.1.	<i>Anaplasmataceae</i>	15
4.1.2.	<i>Rickettsia</i> spp.	17
4.1.3.	<i>Francisella tularensis</i>	18
4.1.4.	<i>Borrelia burgdorferi</i>	19
4.1.5.	<i>Bartonella</i> spp.	21
4.2.	<i>Apicomplexa</i>	22
4.2.1.	<i>Babesia</i> spp.	22
4.2.2.	<i>Theileria</i> spp.	24
4.2.3.	<i>Hepatozoon canis</i>	25
<b>5</b>	<b>Molekulare Diagnostikverfahren</b>	<b>27</b>
5.1.	<i>DNA-Extraktion</i>	27
5.2.	<i>PCR und Gelelektrophorese</i>	28
5.2.1.	<i>Anaplasmataceae</i>	29
5.2.2.	<i>Rickettsia</i> spp.	30
5.2.3.	<i>Francisella tularensis</i>	33
5.2.4.	<i>Borrelia burgdorferi</i>	34
5.2.5.	<i>Bartonella</i> spp.	35
5.2.6.	<i>Apicomplexa</i>	37

<b>6. Diskussion .....</b>	<b>41</b>
<b>7. Zusammenfassung .....</b>	<b>45</b>
<b>8. Summary .....</b>	<b>46</b>
<b>9. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>47</b>
<b>10. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>56</b>
<b>11. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>57</b>
<b>12. Danksagung.....</b>	<b>58</b>

## 1 Abkürzungsverzeichnis

AGES	Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit
$\alpha$ -Gal	Galaktose- $\alpha$ -1,3-Galaktose
bp	Basenpaare
CNL	<i>Candidatus</i> Neoehrlichia lotoris
CNM	<i>Candidatus</i> Neoehrlichia mikurensis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
°C	Grad Celsius
IgM, IgG, IgE	Immunglobulin M, G, E
ITS	intergenic transcribed spacer
mM	Millimolar
min	Minute
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
OMP	Outer Membrane Protein
OmpA	Outer membrane protein A
PCR	Polymerasekettenreaktion
%	Prozent
rpm	rounds per minute
sec	Sekunde
SFG	Spotted Fever Group

s.l.	sensu lato
sp./spp	Spezies (Singular/Plural)
s.s.	sensu stricto
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
T4SS	Typ VI Sekretionssystem
u/ $\mu$ l	unit/Mikroliter
V	Volt

## 2 Einleitung

Ungefähr 28 % aller neu auftretenden Infektionskrankheiten sind von Vektoren übertragene Krankheiten. Zecken und deren Pathogene spielen dabei eine besonders große Rolle, da sie immer häufiger vorkommen und eine Gefahr für Mensch und Tier darstellen (Regier et al. 2019, Dantas-Torres et al. 2012, Duscher et al. 2013a). Österreich hat eine große Vielfalt an Wildtieren, die Reservoirs für viele Pathogene sein und als Wirte für Zecken dienen können. Die Zecken übertragen diese Krankheitserreger wiederum auf andere Wirte. Hierbei können nicht nur der Mensch, sondern auch dessen Haustiere betroffen sein (Duscher et al. 2014a). Großes Augenmerk wird im Rahmen der Forschung dabei häufig auf Hunde gelegt, da sie sich nahe der Vegetation bewegen, so leicht von Zecken befallen und während deren Blutmahlzeit mit unterschiedlichen Pathogenen infiziert werden können (Leschnik et al. 2012).

Der Anstoß für die vorliegende Bachelorarbeit war ein Pathogen-Screening bei Militärhunden des österreichischen Bundesheeres. Für die geplante Studie wurden Zecken im Bereich Kaisersteinbruch im Burgenland gesammelt, welche ursprünglich auf *Anaplasmataceae*, *Rickettsia* spp., *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Francisella tularensis*, *Bartonella* spp., *Babesia* spp., *Theileria* spp. und *Hepatozoon canis* untersucht hätten werden sollen. Als molekulare Detektionsmethode sollte dabei die Polymerasekettenreaktion herangezogen werden. Aufgrund der zur Eindämmung von COVID-19 durch die Regierung verhängten Beschränkungen war es jedoch nicht möglich, die im Labor vorgesehenen Tests durchzuführen. Daher wurde letztlich in Absprache mit dem Betreuer der Arbeit und der Veterinärmedizinischen Universität Wien übereingekommen, anstelle der auf praktischen Ergebnissen basierenden Arbeit eine Literatur-basierte Arbeit zu verfassen.

### **3 Zecken**

#### **3.1. Biologie, Entwicklung und Lebensraum**

Zecken sind Arthropoden, die zur Klasse der Arachnida und der Unterklasse der Acari gehören (Schebeck 2013, AGES). Zusammen mit den Stechmücken sind sie unter den Arthropoden die wichtigsten Vektoren für Pathogene (Dantas-Torres et al. 2012, Šimo et al. 2017). Es gibt drei Familien von Zecken: Ixodidae (Schildzecken), Argasidae (Lederzecken) und Nuttalliellidae, welche eine Mischform zwischen Schild- und Lederzecken mit nur einer bekannten Spezies darstellen (Dantas-Torres et al. 2012, Latif et al. 2012). Weltweit gibt es ungefähr 900 verschiedene Zeckenarten, wovon circa 700 zur Familie der Ixodidae gehören (Dantas-Torres et al. 2012). Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit der Familie der Ixodidae.

Am Capitulum, dem „Kopf“, der Zecke befindet sich ihr Stechapparat mit Kiefertastern (Pedipalpen), die die Hautoberfläche des Wirts abtasten, Kieferfühlern (Cheliceren), welche dessen Haut anschneiden, sowie der Stechrüssel (Hypostom) mit Widerhaken zum Blutsaugen und Anhaften am Wirt (Schebeck 2013, AGES). Zecken sind Poolfeeder, das bedeutet, dass sie mit ihrem Mundwerkzeug eine Wunde in die Haut des Wirtes reißen. Dabei entsteht ein Pool aus Blut und Gewebebrei, von dem sie sich ernähren (Šimo et al. 2017). Ihr Körper ist linsenförmig und die adulten Zecken besitzen vier Beinpaare, an deren Enden ein Haftorgan mit Klauen und Haftlappen sitzt (AGES). Eine Besonderheit der Zecken ist das Haller'sche Organ, welches sich am Ende des ersten Beinpaares befindet und der Wirtsfindung dient, indem es Ausdünstungen wie Ammoniak, Milchsäure und Kohlenstoffdioxid und auch thermische und mechanische Reize von möglichen Wirten wahrnimmt (Schebeck 2013, Leschnik et al. 2012). Auf ihrem Rücken tragen sie einen Schild, das Scutum, das bei Männchen den ganzen und bei Weibchen einen Teil des Rückens bedeckt (Schebeck 2013).



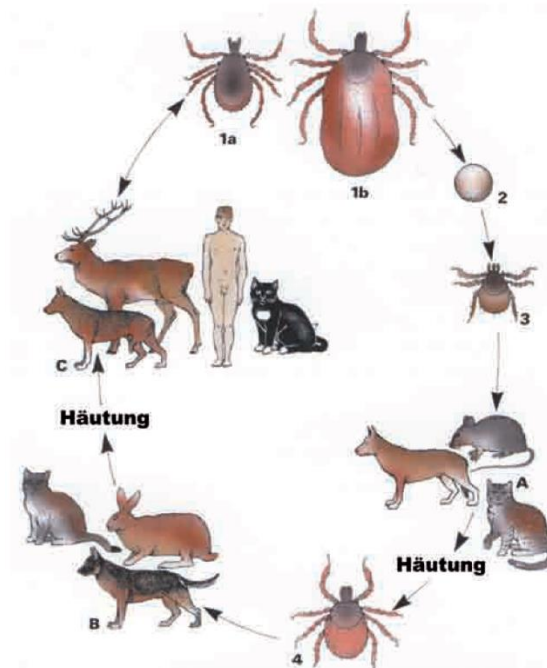


Abb. 1: Entwicklungszyklus von Zecken am Beispiel *Dermacentor reticulatus*, 1a) adultes Männchen, 1b) adultes Weibchen, 2) Ei, 3) Larve, 4) Nymphe, A, B, C) Wirte (aus Mehlhorn und Mehlhorn 2009 in Walochnik und Aspöck 2010)

So gut wie alle in Mitteleuropa heimischen Zeckenarten sind dreiwirtige Zecken (Schebeck 2013). Sie müssen in jedem Entwicklungsstadium (Larve, Nymphe, Adultus) einmal Blut saugen, wobei der Saugakt mehrere Tage bis Wochen andauern kann. Nach jeder Blutmahlzeit lassen sich die Zecken wieder zu Boden fallen und häuten sich in das nächste Stadium (Estrada-Peña et al. 2012). Der Saugakt kann über längere Zeit unentdeckt bleiben, da der Speichel eine Vielzahl von zytolytischen, vasodilatatorischen, antikoagulatorischen, anti-inflammatorischen und anästhetischen Substanzen enthält, die das Gewebe zersetzen und dafür sorgen, dass der Blutfluss zur Saugstelle der Zecke nicht bemerkt und unterbrochen wird. Über den Speichel werden häufig auch Krankheitserreger übertragen, welche bei einer Blutmahlzeit aufgenommen werden und bei der nächsten einen neuen Wirt infizieren können (Šimo et al. 2017).

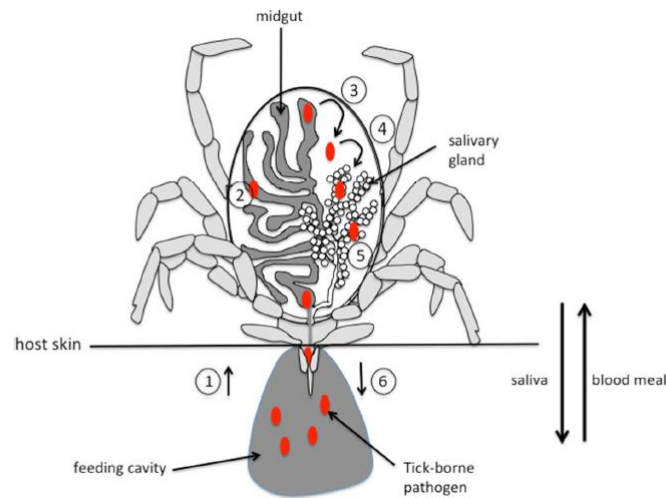


Abb. 2: Vorgang des Blutsaugens und der Pathogenübertragung, 1) Aufnahme des Pathogens während Blutmahlzeit, 2) Eindringen in den Darm, dortiger Verbleib bis zur nächsten Mahlzeit oder 3) Invasion des Zeckenkörpers, 4 & 5) Befall der Speicheldrüsen, 6) Injektion des Wirt während nächster Blutmahlzeit (Šimo et al. 2017)

Die Entwicklung von Zecken vom Larvenstadium bis zum adulten Stadium kann, je nach Umweltbedingungen, von einem bis zu mehreren Jahren dauern (Solano-Gallego et al. 2016, Lejal et al. 2019). Dabei spielen der Lebensraum, die Vegetation und das Klima eine große Rolle. Zecken brauchen eine Luftfeuchte von zumindest 80 %, weswegen hohe Wiesen und Orte mit viel Laubstreu, wie Wälder und Flusstäler, optimal für sie sind (Weiler et al. 2015, Wijnveld et al. 2016, Schebeck 2013). Naturereignisse, wie Fluten, und Umweltbedingungen, wie das Klima, können dabei großen Einfluss auf das Vorkommen und die Aktivität von Zecken haben. Bei Überflutung von Gebieten wird die Anzahl der Zecken drastisch reduziert, nicht nur aufgrund der Überflutung per se, sondern auch wegen der Sedimentierung, die Zecken und Wirtstiere verschüttet. Auch das Fehlen von Wirtstieren, die durch das Wasser vertrieben werden oder umkommen, trägt zur Reduktion der Zecken in einem betroffenen Gebiet bei (Weiler et al. 2017). Die Aktivität der unterschiedlichen Zeckenarten ändert sich in der Regel mit dem (lokalen) Klima. Durch einen verfrühten Temperaturanstieg im Jahr werden auch Zecken entsprechend früher aktiv. Diese Information ist wichtig für die Bestimmung von Krankheitserregern und den Zeitraum deren Übertragung (Duscher et al. 2013a). Der Klimawandel und die damit verbundene Erwärmung tragen auch dazu bei, dass sich Zecken in höheren Gebieten der Alpen ausbreiten und dort überleben können. Selbst Zeckenarten, die noch nicht einheimisch sind, könnten sich aufgrund der veränderten Klimabedingungen nach Einschleppung, beispielweise durch den Tourismus am Mittelmeer, in anderen Gebieten, wie Österreich, etablieren (Duscher et al. 2014a, Regier et al. 2019).

### 3.2. *Ixodes ricinus*

Die Art *Ixodes ricinus* (Gemeiner Holzbock) ist die in Österreich und großen Teilen Europas am häufigsten vorkommende Zeckenart und spielt eine große Rolle bei der Übertragung von Pathogenen (Weiler et al. 2017, Schebeck 2013). In Niederösterreich sind ungefähr 95 % der Zecken, die auf Wirten gefunden werden, von dieser Spezies (Pisazka et al. 2019). Sie zeigen jährlich eine biphasische Aktivität mit einem Hauptpeak im April/Mai und einem zweiten, kleineren im September (Duscher et al. 2013a). Dabei ist diese Zeckenart nicht sehr wählerisch, wen sie befällt. Wirte können Reptilien, Vögel und Säugetiere sein. Typischerweise halten sich *I. ricinus* Zecken in bewaldeten Gebieten auf und können in bis zu 1.000 m Seehöhe gefunden werden (Hornok et al. 2019).

Krankheitserreger, die von *I. ricinus* übertragen oder mit ihnen assoziiert werden, sind Anaplasmen, Rickettsien, Babesien, *Francisella tularensis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) und das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSME) (Dantas-Torres et al. 2012, AGES). Eine Besonderheit dieser Zecken ist, dass sie bei Menschen eine allergische Reaktion gegen das Oligosaccharid Galaktose- $\alpha$ -1,3-Galaktose ( $\alpha$ -Gal), welches beispielsweise in Rind- und Schweinefleisch vorkommt, induzieren können.  $\alpha$ -Gal wurde im gastrointestinalen Trakt der Zecken nachgewiesen und tritt durch deren Speichel in den Wirt ein. Da Menschen und Menschenaffen nicht in der Lage sind, selbst  $\alpha$ -Gal zu synthetisieren, kann durch einen Zeckenbiss die Produktion von Immunglobulin E (IgE), welches Allergien auslöst, induziert werden. (Pisazka et al., 2019). Hunde können, im Gegensatz zu Menschen, selbst  $\alpha$ -Gal produzieren, weswegen sie keine Antikörper dagegen entwickeln sollten, da es ein natürliches Selbst-Antigen darstellt. Im Rahmen einer Studie wurden gesunde Hunde von Zecken gestochen und anschließend beobachtet. Nach dem Stich von *I. ricinus* wurden jedoch Immunglobuline M, G und auch E (IgM, IgG) bei den Hunden detektiert, was darauf hinweist, dass ein Bestandteil des Zeckenspeichels in Kombination mit  $\alpha$ -Gal eine Immunreaktion in Hunden auslöst und auch eine anschließende allergische Reaktionen auf Fleisch nicht völlig auszuschließen ist. Es wurden auch Hinweise gefunden, dass die durch  $\alpha$ -Gal induzierten IgMs eine protektive Wirkung für Hunde gegen *Anaplasma phagocytophilum* haben könnten (Hodžić et al. 2019).

### 3.3. *Ixodes inopinatus*

Die Spezies *Ixodes inopinatus* hat große Ähnlichkeit mit *I. ricinus*. Sie gilt als relativ neue Art, nachdem 2014 erstmals die Unterscheidung zwischen den beiden gemacht wurde. Es wird

angenommen, dass die Spezies zwar schon länger besteht, zuvor aber nie von *I. ricinus* differenziert wurde (Estrada-Peña et al. 2014). Unterschieden werden können die beiden Arten durch morphologische und genetische Parameter, welche zusätzlich darauf schließen lassen, dass die beiden Spezies sehr nahe verwandt sind. *I. inopinatus* wurde zuerst nur im Mittelmeerraum vermutet, doch gibt es auch Berichte über deren Vorkommen in Deutschland, Österreich und Rumänien (Chitimia-Dobler et al. 2018).

Über das Wirtsspektrum, das Aktivitätsmuster und das Vektorpotential dieser Art ist noch nicht viel bekannt. Diese Zeckenart wurde bereits von Füchsen, Echsen und Schafen gesammelt (Estrada-Peña et al. 2014, Chitimia-Dobler et al. 2018). Auch zur Rolle von *I. inopinatus* als Vektor ist noch weitere Forschung erforderlich. Derzeit liegen schon erste Hinweise auf Erreger, die diese Spezies tragen und übertragen könnten, vor. Es gibt bereits Zecken, die auf *Rickettsia* spp., *Borrelia* spp. und *A. phagocytophilum* positiv getestet wurden (Chitimia-Dobler et al. 2018, Hauck et al. 2019). In einer Studie in Deutschland wurden 3.845 DNA-Proben von *Ixodes*-Zecken in *I. inopinatus* und *I. ricinus* mittels des 16S rRNA Gens differenziert und auf *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp. und *A. phagocytophilum* untersucht. Von diesen Proben waren 4 % Zecken der Spezies *I. inopinatus* und 96 % der Art *I. ricinus*. Es stellte sich heraus, dass ein höherer Prozentsatz von *I. inopinatus* (34 %) positiv auf *Borrelia* spp. war, während es bei *I. ricinus* nur 25 % waren. Bei den anderen Krankheitserregern waren die Zahlen zwischen beiden Zeckenarten vergleichbar (Hauck et al. 2019).

#### **3.4. *Dermacentor reticulatus***

Die zweithäufigste Spezies in Mitteleuropa ist *Dermacentor reticulatus* (Auwaldzecke). Wie der deutsche Name bereits verrät, kommt sie in Auwäldern und auch sumpfigen und Flussgebieten bis 1.000 m vor. Gelegentlich kann sie aber auch in Grünanlagen von Städten gefunden werden (AGES, Rubel et al. 2015, Hornok et al. 2019). Ihr Entwicklungszyklus dauert ein bis zwei Jahre, wobei die Entwicklung vom Ei zur ungesogenen adulten Zecke in einer Wachstumssaison geschehen muss (Rubel et al. 2015).

Zu den Wirten von *D. reticulatus* gehören in unreifen Stadien kleine Säugetiere wie Nagetiere und Insektivoren (Pfäffle et al. 2015). Die adulten Zecken befallen eher größere Säugetiere wie Rinder, Hunde und Füchse (Rubel et al. 2015, Hornok et al. 2019). Die Aktivitätspeaks dieser Zeckenart liegen im März und Oktober (Duscher et al. 2013a). Beim Flagging können jedoch nur eher selten Larven und Nymphen dieser Art gesammelt werden, da *D. reticulatus* in diesen Stadien eher endophil lebt. Das bedeutet, dass sich die Larven an kleinen Nagetieren

anheften und Blut saugen. Die Wirte nehmen sie mit in ihre Nester und Baue, wo sich die Larven nach Beendigung der Blutmahlzeit fallen lassen und zu Nymphen häuten. Die Nymphen befallen die Wirte im Bau dann erneut und werden von diesen nach der Häutung als Adulti zurück an die Erdoberfläche gebracht. Dass sich die gesogenen Larven erst in den Bauen fallen lassen, könnte durch mehrere Faktoren beeinflusst werden, beispielsweise durch das Verhalten des Wirtes, die veränderte Photoperiode oder durch umgebungsbedingte Faktoren (Pfäffle et al. 2015, Hornok et al. 2019).

*Dermacentor reticulatus* werden aufgrund ihres schnellen Entwicklungszyklus, ihrer hohen Reproduktionsrate, ihrer Fähigkeit zur Umwelтанpassung und zur Beherrschung und Übertragung vieler Pathogene als ideale Vektoren angesehen (Hodžić et al. 2017a). FSME, *A. phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *F. tularensis*, *Rickettsia* spp., *Babesia canis*, *B. burgdorferi s.l.* und eventuell auch *Theileria annae* gehören zu den Krankheitserregern, die in *D. reticulatus* gefunden wurden (Pfäffle et al. 2015, Hodžić et al. 2017a). Hierbei wird angenommen, dass diese Zecken nicht unbedingt eine Gefahr für den Menschen darstellen, sondern ein wichtiger Bestandteil zur Aufrechterhaltung des enzootischen Zyklus der Pathogene sind (Pfäffle et al. 2015).

### **3.5. *Haemaphysalis concinna***

Auf Vögeln stellt *Haemaphysalis concinna* die zweithäufigste Zeckenart nach *I. ricinus* und beim Sammeln mittels Flagging die dritthäufigste Spezies in Mitteleuropa dar. Sie lebt bevorzugt in Laub- und Mischwäldern von Regionen mit warmen und feuchten Sommern (Rubel et al. 2018). In Österreich kann man sie oftmals in der Nähe der Donau und der March finden (Rubel et al. 2018). Sie zeigen eine monophasische Aktivität vom späten Frühling bis in den frühen Herbst mit einem Peak im Juni/Juli (Hornok et al. 2019, Duscher et al. 2013a).

Larven und Nymphen parasitieren häufig Vögel, Reptilien und kleinere Säugetiere. Diese beiden Entwicklungsstadien können große Distanzen durch Vögel zurücklegen. Ihre Entwicklung wird photoperiodisch reguliert und die Diapause durch kürzer werdende Tage initiiert. Adulte *H. concinna*-Zecken hingegen befallen eher Rehe und Rothirsche. Pathogene, die in dieser Spezies nachgewiesen werden konnten, sind FSME, *Anaplasmata* spp., *Coxiella burnetii*, *B. burgdorferi s.l.*, *F. tularensis*, *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. und *Theileria* spp. (Rubel et al. 2018).

### 3.6. *Haemaphysalis inermis*

Zecken der Spezies *Haemaphysalis inermis* sind in Österreich eher selten zu finden, da eine Etablierung nicht erwiesen war. Allgemein ist diese Art spärlich verteilt mit allmählich vermehrtem Vorkommen in Ungarn und Spanien (Estrada-Peña et al. 2017). Sie präferiert bewaldete Gebiete mit nicht sehr dicht stehenden Bäumen, dafür aber dichter Bodenvegetation (Hornok et al. 2019).

Ihr Lebenszyklus dauert je nach Umweltbedingungen etwa ein bis drei Jahre (Estrada-Peña et al. 2017). Wirte können Rinder, Hirsche, Wildschweine, sowie der Mensch sein (Hornok et al. 2019). Besonders an ihnen ist, dass die Blutmahlzeiten der unreifen Stadien nur einige Stunden andauern, bevor sie sich zu Boden fallen lassen. Bisher konnte nur nachgewiesen werden, dass *H. inermis* als Überträger von FSME fungiert. Es wird aber vermutet, dass diese Spezies auch ein Vektor von *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp. sein könnte (Estrada-Peña et al. 2017).

## 4 Pathogene

### 4.1. Bakterien

#### 4.1.1. *Anaplasmataceae*

Die Familie der *Anaplasmataceae* gehört zur Ordnung der Rickettsiales und besteht aus den sechs Gattungen *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Aegyptionella*, *Wolbachia*, *Neorickettsia* und *Candidatus Neoehrlichia*. Diese sind kleine, obligat intrazelluläre, gramnegative Bakterien, die mit den Mitochondrien verwandt sind und durch Arthropoden, wie Zecken, übertragen werden. Je nach Gattung infizieren sie spezifische Zellen des Blutes und Immunsystems des Wirtes, wie neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Thrombozyten, Erythrozyten oder auch Endothelzellen. *Anaplasmataceae* vermehren sich allgemein in Vakuolen im Zytoplasma der Wirtszellen (Pruneau et al. 2014). Innerhalb der Familie der *Anaplasmataceae* gibt es mehrere Spezies, die eine Vielzahl von Tieren infizieren können (Andersson et al. 2017). Infektionen mit diesen Bakterien bei domestizierten Tieren sind schon seit Anfang des 20. Jahrhunderts bekannt, sie wurden allerdings erst vermehrt erforscht, nachdem auch humanpathogene Spezies entdeckt wurden (Dahmani et al. 2017).

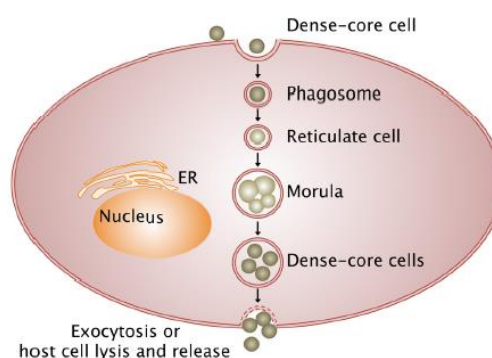


Abb. 3: Intrazellulärer Lebenszyklus von *Anaplasmataceae*, Elementarkörperchen mit dichtem Kern entwickeln sich im Phagosom zu Retikularkörperchen, welches Morulae (vegetative Form) bilden, Retikularteilchen reifen zu Elementarkörperchen, die durch Exozytose oder Zellyse frei werden (Pruneau et al. 2014)

*Anaplasmataceae* besitzen große Anpassungsfähigkeit, da sie sowohl in invertebraten, als auch in vertebraten Wirten überleben können. Aufgrund des Organisationsgrades der DNA können zwei Entwicklungsstadien unterschieden werden. Die Elementarkörperchen sind Zellen mit dichtem Kern und stellen die infektiöse, extrazelluläre Form der Bakterien dar. Elementarkörperchen werden durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Sie können die Verschmelzung des Endosoms mit einem Lysosom verhindern und entgehen so dem Abbau in der Wirtszelle. Davon unterschieden sich die Retikularkörperchen, die einen lockereren Kern

haben und intrazellulär vorliegen. Letztere sind zur Zellteilung fähig und bilden die charakteristischen Morulae in den Phagosomen der Wirtszellen. Nach der Teilung reifen die Retikularkörperchen wieder zu Elementarkörperchen und werden exozytotisch aus der Zelle ausgeschieden (Pruneau et al. 2014).

Die Genexpression der *Anaplasmataceae* wird den Umständen entsprechend angepasst. So werden beispielsweise die Outer Membrane Proteine (OMP) der Bakterien in Abhängigkeit von der jeweils befallenen Wirtszelle (Zecke oder Mensch/Tier) stark reguliert. OMP sind wichtig für den Erstkontakt, für die Interaktion mit der Wirtszelle, für die Integrität der äußeren Membran und für den Nährstofftransport des Bakteriums. Ein weiteres Beispiel ist das Typ IV Sekretionssystem (T4SS), welches bei allen *Anaplasmataceae* vorhanden ist. Es injiziert Effektorproteine in eukaryotische Zellen und es wurde nachgewiesen, dass die Expression der Proteine des T4SS in *Anaplasma phagocytophilum* bei der Infektion humaner und Zeckenzelllinien hochreguliert wird (Pruneau et al. 2014).

Die Gattung *Anaplasma* kann in Zecken nur transstadial, also innerhalb des Entwicklungszyklus einer Zecke, nicht aber an die nächste Generation, übertragen werden, weswegen Reservoirwirte für die Aufrechterhaltung des Infektionszyklus wichtig sind (Hornok et al. 2014, Pruneau et al. 2014). Als Reservoirwirte von *A. phagocytophilum* können Vögel, wilde Huftiere, Nagetiere, Igel und Rotfüchse dienen (Hornok et al. 2014, Duscher et al. 2014a, Hodžić et al. 2015). *A. phagocytophilum* ist in Europa der häufigste Erreger von Anaplasmosen, beispielsweise der kaninen und humanen granulozytären Anaplasrose (Andersson et al. 2017, Víchová et al. 2014). Eine große Zahl von Tieren, darunter Hunde, Katzen, Pferde, Wiederkäuer und Vögel, kann von *A. phagocytophilum* infiziert werden, aber auch der Mensch (Pantchev et al. 2015, Estrada-Peña et al. 2012). Der Hauptvektor dieses Pathogens ist die Spezies *I. ricinus*. In Österreich wurde dazu berichtet, dass dieses Pathogen auch in *H. concinna* nachgewiesen werden konnte (Namina et al. 2019, Leschnik et al. 2012). In Österreich sind zwischen 1,0 und 8,7% aller gesammelten *I. ricinus* Zecken positiv auf *A. phagocytophilum* (Schötta et al. 2017). Der Krankheitserreger wird allerdingst frühestens 24 bis 48 Stunden nach Anheftung der Zecke über den Speichel an den Wirt übertragen (Estrada-Peña et al. 2012, Pantchev et al. 2015). Diese Bakterienart bindet an Glykoproteine an der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten und wird so in die Zelle zur Reproduktion aufgenommen (Pantchev et al. 2015).

Es wurden Hinweise dafür gefunden, dass *Ixodes scapularis* Zecken aufgrund der Infektion mit *A. phagocytophilum* kälteresistenter werden, da diese Zecken dann das *iafgp*-Gen,



welches für ein Anti-gefrier-Glykoprotein kodiert, vermehrt exprimieren (Lejal et al. 2019). Auch wird angenommen, dass Hunde, wie im Kapitel zur Spezies *I. ricinus* beschrieben, nach einem Zeckenstich Antikörper gegen  $\alpha$ -Gal produzieren können, die gleichzeitig eine protektive Wirkung gegen *A. phagocytophilum* aufweisen (Hodžić et al. 2019).

Der Genus *Candidatus Neoehrlichia* hat in den vergangenen Jahren Aufmerksamkeit aufgrund seiner Relevanz für die Gesundheit von Tier und Mensch erhalten. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (CNM) wurde in Menschen, Hunden, Igel, Bären etc., sowie in Zecken, die von Rotfüchsen gesammelt wurden, gefunden und scheint in Mitteleuropa recht weit verbreitet zu sein (Hodžić et al. 2015a, Duscher et al., 2015, Hodžić et al. 2015b). CNM dürfte aber als Pathogen nur für immungeschwächte Menschen eine Rolle spielen (Schötta et al. 2017). Als Vektor dient die Zeckenspezies *I. ricinus*, wobei CNM auch in *D. reticulatus* und *H. concinna* gefunden wurde (Hodžić et al. 2015b). 2017 wurden im Rahmen einer Studie in Österreich 4,3 % der gesammelten *I. ricinus* Zecken positiv auf CNM getestet (Schötta et al. 2017). Ebenfalls in Österreich konnte 2015 das erste Mal *Candidatus Neoehrlichia* sp. in Rotfüchsen festgestellt werden. Diese glich nach der Sequenzierung des 16S- und groEL-Gens aber eher der Art *Candidatus Neoehrlichia lotoris* (CNL), welche mit Waschbären in den USA assoziiert wird. Innerhalb von Europa gibt es beachtliche genetische Variation in CNM, bei CNL wurde bis jetzt jedoch nur eine gefunden. Potentielle Vektoren für CNL scheinen ebenfalls *Ixodes* spp. zu sein (Hodžić et al. 2015b).

Bakterien der Gattung *Ehrlichia* können einige Krankheiten, wie kanine und humane monozytäre Ehrlichiose, auslösen. Im Speziellen ist *E. canis* das der kaninen Ehrlichiose zugrundeliegende Pathogen. Es kann außer Hunden auch Menschen, Katzen und wilde Carnivoren infizieren (Cardoso et al. 2015). Reservoirwirt ist beispielsweise der Goldschakal, und *Rhipicephalus sanguineus* ist Vektor für dieses Pathogen (Duscher et al. 2014a, Cardoso et al. 2015).

#### **4.1.2. *Rickettsia* spp.**

Rickettsien sind obligat intrazelluläre, gramnegative, kokkoide Stäbchen-Bakterien, die Endothelzellen von kleinen bis mittelgroßen Blutgefäßen des Wirtstieres infizieren. Sie werden durch induzierte Phagozytose in die Zelle aufgenommen und verlassen das Phagosom relativ schnell wieder, sobald sie in die Zelle gelangt sind, um dem Abbau zu entkommen. Im Zytoplasma teilen sich die Bakterien dann bis sie wieder ins Blut entlassen werden. Eine Infektion mit *Rickettsia* spp. wirkt sich auf die Integrität und die Barrierefunktion der Gefäße

aus. Sie kann zu unterschiedlichen Symptomen, von Lungenödemen bis hin zum Multiorganversagen, führen (Sahni et al. 2013). Nachgewiesen wurden Rickettsien schon bei Menschen, sowie bei einigen wilden und domestizierten Tieren, wie beispielsweise Hunden (Hodžić et al. 2015, Leschnik et al. 2012, Dantas-Torres et al. 2012). Diese Krankheitserreger kommen weltweit vor, und ihre Vektoren können Zecken der Arten *R. sanguineus*, *I. ricinus* und *Dermacentor* spp. sein (Roux et al. 1996, Dantas-Torres et al. 2012, Wijnveld et al. 2016, Duscher et al. 2016). Auch *H. concinna* Zecken wurden positiv auf *Rickettsia*-DNA getestet (Leschnik et al. 2012). Manche Spezies werden auch von Flöhen und Läusen übertragen (Lejal et al. 2019, Sahni et al. 2013). Sie können transovariell und transstadial übertragen werden, weswegen sie nicht so stark auf Reservoirwirte angewiesen sind wie viele andere Arten (Sahni et al. 2013).

Man kann Rickettsien in vier Gruppen einteilen (Sahni et al. 2013):

- Anzestralsgruppe
- Spotted Fever Group (SFG, Fleckfiebergruppe)
- Typhus Gruppe
- Übergangsgroupe

Von diesen sind die ersten beiden Gruppen Zecken-assoziiert, die Typhus Gruppe Laus- und Floh-assoziiert und die Übergangsgroupe Zecken-, Milben- und Floh-assoziiert (Sahni et al. 2013). Relevant für diese Arbeit sind vor allem *Rickettsia* spp. der SFG, da sie Auslöser für humane und auch kanine Erkrankungen sind (Sahni et al. 2013, Leschnik et al. 2012). In Österreich sind Rickettsien das am zweithäufigsten detektierte Pathogen in Zecken. Die Infektionsrate liegt zwischen 12 und 17 % (Schötta et al. 2017, Leschnik et al. 2012). Dieser Prozentsatz kann in gewissen Hotspots, wo die Zecken gesammelt wurden, bis zu 66,7 % betragen. Die häufigsten *Rickettsia* spp. in *I. ricinus* Zecken in Österreich sind *R. helvetica*, *R. raoultii*, *R. monacensis* und *R. slovaca*, bei welchen es sich ausschließlich um SFG-Rickettsien handelt (Schötta et al. 2017, Sahni et al. 2013, Wijnveld et al. 2016).

#### **4.1.3. *Francisella tularensis***

Die Tularämie, auch Hasenpest genannt, wird durch das fakultativ intrazelluläre, gramnegative, kokkoide Stäbchenbakterium *Francisella tularensis* ausgelöst (Sjöstedt et al. 1997, Kwit et al. 2020, Celli und Zahrt 2013). Wenn es zur intrazellulären Infektion kommt, sind zum Beispiel Makrophagen und dendritische Zellen betroffen. Die Bakterien werden phagozytotisch aufgenommen und entfliehen dem Phagosom, um sich im Zytosol zu

vermehren. Nach der Replikation kommt es zum Zelltod, die Bakterien werden frei und können die nächsten Zellen infizieren (Celli und Zahrt 2013). Es gibt mehrere Wege der Übertragung, beispielsweise durch Kontakt mit infiziertem Gewebe oder infizierten Tieren, durch Zeckenbisse oder durch Inhalation oder Ingestion des Bakteriums. Bei Menschen, Hunden und Katzen wurde bereits nachgewiesen, dass sie an *F. tularensis* erkranken können (Kwit et al. 2020). In Österreich gibt es endemische Gebiete, vor allem entlang der March und an der Grenze zur Slowakei. Als Reservoir dienen Nagetiere und Hasen. Zecken spielen eher in der Aufrechterhaltung der Naturherde eine Rolle, sind jedoch selten Grund für eine Infektion mit diesem Krankheitserreger (AGES).

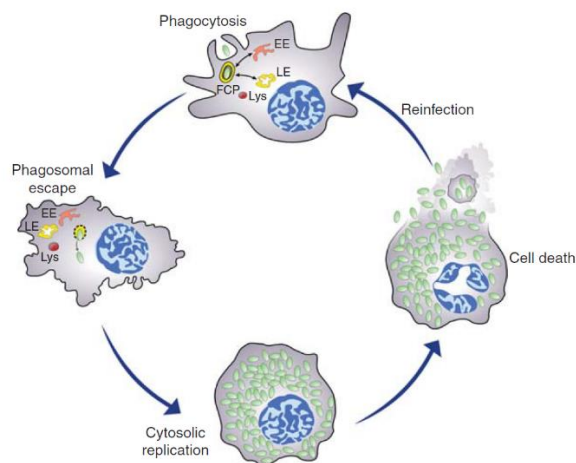


Abb. 4: Intrazellulärer Infektionszyklus von Phagozyten durch *F. tularensis*, nach der Phagozytose liegen die Bakterien im frühen Phagosom (FCP) vor, welches mit frühen (EE) und späten (LE) endozytotischen Kompartimenten interagiert, aber nicht mit Lysosomen (Lys). Die Bakterien zerstören die FCP-Membran, replizieren sich im Zytosol und werden nach dem Zelltod freigesetzt und können die nächsten Phagozyten infizieren (Celli und Zahrt 2013)

#### 4.1.4. *Borrelia burgdorferi*

Bakterien der Gattung *Borrelia* sind relativ große, gramnegative, helikale Bakterien, die zur Familie der Spirochäten gehören und ohne Wirt nicht überleben können (Davidson et al. 1999, Stanek 2018, Pantchev et al. 2015). *Borrelia burgdorferi* s.l. ist ein Überbegriff für mehr als 20 Genospezies, wovon sechs bisher bekannte Humanpathogene sind, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. burgdorferi sensu stricto* (s.s.), *B. spielmanii* und *B. lusitaniae*, und zwei bei natürlichen Infektionen von Hunden nachgewiesen wurden, *B. burgdorferi* s.s. und *B. garinii* (Stanek 2018, Pantchev et al. 2015). Die durch *B. burgdorferi* s.l. ausgelöste Lyme Borreliose ist eine häufige von Vektoren übertragene Krankheit bei Mensch und Hund und kommt endemisch in Österreich vor (Estrada-Peña et al. 2012, Duscher et al. 2014a, Leschnik et al.

2012, Schötta et al. 2017). Wichtig für die Infektion von Zecken, und folglich auch von Säugetieren, sind Reservoirwirte wie Nagetiere, an denen Larven Blut saugen und ihre Infektion transstadial weitergeben (Estrada- Peña et al. 2012, Duscher et al. 2014a, Pantchev et al. 2015). Die Übertragung dieses Pathogens läuft vor allem über Zecken der Spezies *I. ricinus* ab (Estrada-Peña et al. 2012, Leschnik et al. 2012).

Bevor die Infektion eines Säugetierwirts stattfinden kann, muss der Krankheitserreger jedoch zuerst durch die Temperaturerhöhung bei Anheftung der Zecke an einen Wirt „aktiviert“ werden. Borrelien befinden sich im inaktiven Zustand im Darm der Zecke und werden durch Wärme zur Migration in die Speicheldrüsen animiert. Daher kann die Übertragung des Pathogens erst 16 bis 65 Stunden nach Anheftung erfolgen. Kürzere Transmissionszeiten sind auch möglich, aber nur dann, wenn Zecken schon vor der Anheftung systemisch infiziert waren, oder wenn eine Zecke nach erstmaliger Anheftung wieder abfällt, daher schon erwärmt wurde und so den nächsten Wirt schneller infizieren kann (Pantchev et al. 2015). Ein typischer Infektionsverlauf mit *B. burgdorferi* s.l. wäre die initiale Adhärenz der Bakterien an Haut- oder Schleimhautzellen mit anschließender Invasion des Wirts. Die Bakterien verteilen sich über das Blut- oder Lymphgefäßsystem im Wirt und reichern sich dann in Zielgeweben, meist in Gelenken, aber auch in der Haut oder im Nervensystem, an (Petzke und Schwartz 2015, Leschnik et al. 2010, Liebisch et al. 1998). Die pathologischen Auswirkungen einer *B. burgdorferi* s.l.-Infektion werden allgemein eher als Resultat der induzierten Entzündungsreaktion des Wirts angesehen, und weniger der Toxinproduktion der Bakterien selbst (Petzke und Schwartz 2015).

In Österreich sind zwischen 4 und 33 % von Zecken positiv auf Borrelien (Duscher et al. 2014a). In einer Studie von Schötta et al. (2017) wurden *I. ricinus* Zecken aus Österreich auf unterschiedliche Erreger getestet, mit dem Ergebnis, dass *B. burgdorferi* s.l. am häufigsten detektiert werden konnte. Davon waren *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. valaisiana* und *B. garinii* die am häufigsten nachgewiesenen Spezies. Im Zuge dieser Studie wurden erstmals *B. lusitaniae* und *B. spielmanii* in Österreich festgestellt. Bemerkenswert ist auch, dass es Hinweise darauf gibt, dass *B. burgdorferi* s.l.-infizierte Zecken eine erhöhte Toleranz gegenüber Austrocknung und hohen Temperaturen aufweisen, was zu einer erhöhten Prävalenz im Sommer führen könnte (Lejal et al. 2019).

#### 4.1.5. *Bartonella* spp.

*Bartonella* spp. sind kleine, geschwungene, pleomorphe, hämotrope, gramnegative und fakultativ intrazelluläre Bakterien, die sich abhängig von der jeweiligen Art an einen bestimmten primären Reservoirwirt adaptiert haben. Einige Spezies besitzen zoonotisches Potential und auch akzidentelle Wirte können von ihnen betroffen sein (Deng et al. 2012, Álvarez-Fernández et al. 2018). Reservoirwirte können Hunde, Katzen, Rotfüchse, Wiederkäuer, Nagetiere und Menschen sein (Norman et al. 1995, Hodžić et al. 2015a, Deng et al. 2012, Regier et al. 2016). Säugetiere werden entweder durch Arthropodenstiche, zum Beispiel Läuse, Flöhe, Sandfliegen und teilweise auch Zecken, oder durch Kratzer oder Bisse von Tieren, die schon vorher mit Fäzes von Vektoren kontaminiert gewesen waren, infiziert. Bisher wurden 38 verschiedene *Bartonella* spp. detektiert, wovon zumindest 13 humanpathogen sind (Álvarez-Fernández et al. 2018, Deng et al. 2012).

Eine Infektion mit *Bartonella* spp. kann in dem Wirt, an den die Art sich angepasst hat, zu einer langanhaltenden Bakteriämie führen, welche jedoch normalerweise nicht zur sofortigen Schädigung des Wirts führt, solange dieser nicht immungeschwächt ist (Diniz et al. 2007, Deng et al. 2012). Diese Bakterien kolonisieren in stark vaskularisierten Geweben und scheinen Endothelzellen als primäre Nische nach der initialen Infektion zu nutzen (Deng et al. 2012, Álvarez-Fernández et al. 2018). Sie werden eventuell von den Zellen internalisiert und persistieren dann in oder neben den Zellen, von wo sie dann periodisch in die Blutbahn „gesät“ werden. Sobald sie in der Blutbahn auf Erythrozyten treffen, binden sie an diese und dringen mittels Invagination ein. Die Membran des Erythrozyten fusioniert am Kontaktpunkt des Invaginationshalses, wodurch sich die Bakterien dann in einer intrazellulären Vakuole befinden, reproduzieren und persistieren bis das Ende der Lebensspanne des Erythrozyten erreicht ist (Deng et al. 2012). Die Invasion von Erythrozyten ist allerdings wirtsspezifisch und passiert nur bei den Wirten, an die die Spezies adaptiert ist (Regier et al. 2016).

Die Spezies, die am häufigsten Krankheitsverursacher bei Mensch und Tier ist, ist *B. henselae*, welche Menschen, Hunde und Katzen infizieren kann. Als primäres Reservoir dient die Katze (Deng et al. 2012, Regier et al. 2016). Für den Menschen relevant sind auch *B. quintana* und *B. bacilliformis*. *B. quintana* löst das Schützengrabenfieber aus, *B. bacilliformis* verursacht Oroya-Fieber und Verruga peruana (Regier et al. 2016, Deng et al. 2012). Bei Hunden sind beispielsweise *B. vinsonii berkhoffii*, *B. henselae* und *B. clarridgeiae* von veterinärmedizinischer Relevanz, da sie Erkrankungen wie Endokarditis, Myokarditis und

granulomatöse Meningoenzephalitis verursachen (Deng et al. 2012, Diniz et al. 2007, Álvarez-Fernández et al. 2018, Regier et al. 2016).

Die DNA von *Bartonella* spp. wurde in Europa schon mehrfach in Zecken vorgefunden. Einige Studien berichten von Prävalenzen von bis zu 40 % (Regier et al. 2016). Müller et al. (2016) haben in einer Studie Zecken der Spezies *I. ricinus* untersucht und eine österreichweite Infektionsrate von 2,1 % festgestellt. Im Rahmen dieser Studie wurden in Wien zwei Mal (2005 und 2013) Zecken gesammelt und beide Male eine höhere Rate von 7,5 % und 6,7 % nachgewiesen. Im Burgenland lag der Prozentsatz hingegen bei nur 1,6 %.

## **4.2. Apicomplexa**

### **4.2.1. Babesia spp.**

Protozoen des Genus *Babesia* gehören der Ordnung der Piroplasmida an und sind intraerythrozytäre Blutparasiten mit teilweise zoonotischem Potential (Pantchev et al. 2015, Schnittger et al. 2012, Yabsley und Shock et al. 2012). Der Parasit kann eine große Bandbreite von Säugetieren und auch Vögeln befallen. Vektoren und Endwirte sind mitunter Zecken der Gattungen *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Dermacentor* und *Haemaphysalis* (Schnittger et al. 2012, Solano-Gallego et al. 2016, Remesar et al. 2019, Jalovecka et al. 2019). Neben der transstadialen und transovariellen Übertragung gibt es bei Babesien auch die Möglichkeit der transplazentalen Übertragung in Säugetieren, wodurch Neugeborene schon infiziert auf die Welt kommen (Jalovecka et al. 2019, Fukumoto et al. 2005). Besonderes Augenmerk wird häufig auf die Babesiose bei Hund und Mensch aus gesundheitlichen, sowie auf Rinder aus gesundheitlichen und wirtschaftlichen Gründen gelegt (Andersson et al. 2017, Lejal et al. 2019, Leschnik et al. 2012, Salano-Gallego et al. 2016, Schnittger et al. 2012). Säugetierreservoirs für *Babesia* variieren je nach Spezies, aber auch die Zecken selbst können Reservoirs sein. Letzteres ist möglich durch die transovarielle Übertragung des Parasiten, weswegen auch die Wahrscheinlichkeit, dass die gesamte Zeckenpopulation an einem Ort infiziert ist, recht hoch ist, sobald Babesien eingeschleppt wurden. (Yabsley und Shock 2012, Schötta et al. 2017). In Österreich wurde in einer Studie die Hälfte der Rotfüchse positiv auf *B. microti*-like sp., auch *B. annae*, *Theileria annae*, *B. vulpes* genannt, getestet. Rotfüchse werden als potentielles Reservoir für diese Art erachtet (Duscher et al. 2014b, Hodžić et al. 2015a).

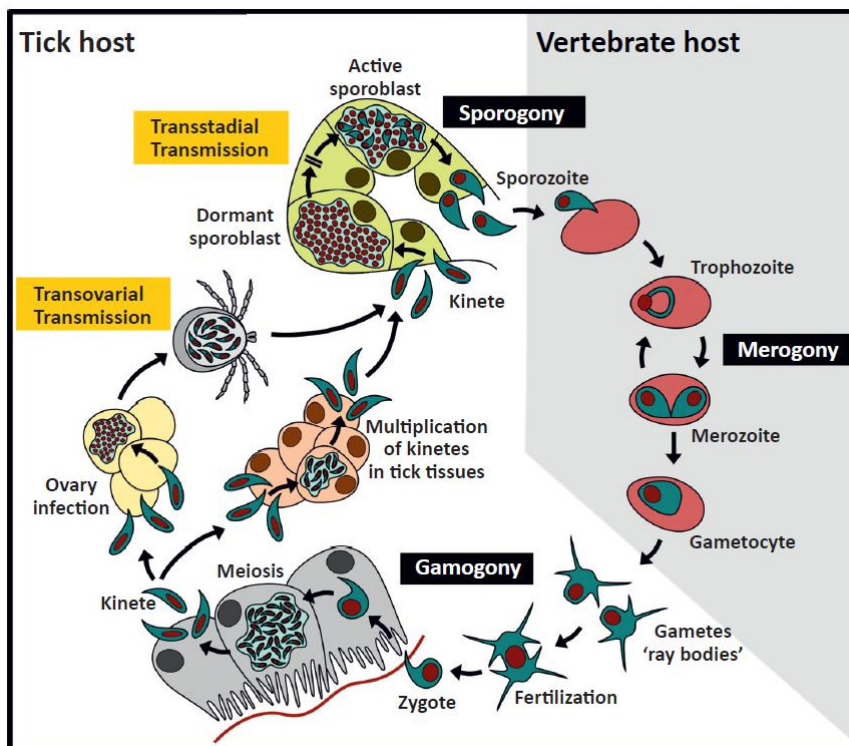


Abb. 5: Lebenszyklus von *Babesia sensu stricto*. Infektion des vertebraten Wirts durch infektiöse Sporozoiten während der Blutmahlzeit der Zecke, die in Erythrozyten eindringen, wo sie sich zu Trophozoiten entwickeln. Diese teilen sich mittels Merogonie zu Merozoiten, treten dann aus der Zelle aus und infizieren weitere Erythrozyten. Merozoiten entwickeln sich zu intraerythrozytären Gametocyten, die von Zecken aufgenommen werden und in deren Darm zu Gameten, auch Strahlenkörper genannt, werden. Die Fusion von Gameten erzeugt Zygoten, die das Darmepithel befallen, wo sie sich meiotisch teilen und so Kineten produzieren, welche anschließend Ovarien und Speicheldrüsen der Zecke befallen. In den Speicheldrüsen befinden sich jetzt Sporoblasten, welche bei der nächsten Blutmahlzeit aktiviert werden und den nächsten Wirt infizieren können. (Jalovecka et al. 2019)

Der Lebenszyklus von Babesien kann in zwei asexuelle und eine sexuelle Reproduktionsphase eingeteilt werden. Während der Blutmahlzeit einer Zecke auf einem Säugetier werden die infektiösen Sporozoiten durch den Speichel auf den Wirt übertragen, welche dann in Erythrozyten eindringen. Dort entwickeln sie sich zu Trophozoiten, welche die vegetative Form des Parasiten darstellt. Die erste asexuelle Reproduktionsphase ist die Merogonie, in der sich die Trophozoiten zu Merozoiten teilen, welche dann die Zelle verlassen und neue Erythrozyten infizieren können. Danach entwickeln sich intraerythrozytäre Merozoiten zu Gametocyten weiter. Anschließend müssen die infizierten Erythrozyten von einer Zecke aufgenommen werden, um zu Gameten, bei Babesien auch Strahlenkörper genannt, zu werden. Jeweils zwei Gameten verschmelzen dann zu einer Zygote, die in das Darmepithel der Zecke eindringt, wo sie sich meiotisch teilt. Diese Prozesse werden als Gamogonie bezeichnet und stellen die Phase der sexuellen Reproduktion dar. Das Resultat der letzten Teilung sind die Kineten, welche mittels der Hämolymphe der Zecken in die

Speicheldrüsen und bei Weibchen darüber hinaus in die Ovarien wandern. So werden die Eier bereits in den Ovarien infiziert (transovarielle Transmission). In den Speicheldrüsen entwickeln sich die Kineten zu Sporoblasten, welche ein multinukleäres Synzytium sind. In den Zellen der Speicheldrüsen befinden sich dann die Sporoblasten. Diese sind während der Häutung der Zecke inaktiviert und werden bei der nächsten Blutmahlzeit wieder aktiviert (transstadiale Transmission). Die zweite asexuelle Reproduktionsphase ist die Sporogonie, bei der ein Sporoblast mehrere, erneut infektiöse Sporozoiten produziert, die den nächsten Wirt befallen können (Jalovecka et al. 2019).

Infektionen bei Hunden und Menschen können einen asymptomatischen Verlauf nehmen, aber auch zu Multiorganversagen und Tod führen, abhängig vom Alter, dem Immunstatus und eventuellen anderen Infektionen des Erkrankten, aber auch von der verursachenden *Babesia* sp. (Schnittger et al. 2012, Solano-Gallego et al. 2016). Auslöser für die menschliche Babesiose sind häufig *B. divergens* und *B. microti* (Yabsley und Shock 2012, Solano-Gallego et al. 2016). Besonders relevant als Ursache von kaninen Babesiosen in Europa sind unter anderem *B. canis*, *B. gibsoni*, *B. microti*-like sp. und *B. vogeli* (Solano-Gallego et al. 2016, Hodžić et al. 2015a, Schnittger et al. 2012).

In österreichischen Zecken wurden Infektionsraten von bis zu 51,7 % beschrieben. In einer Studie mit Zecken der Art *I. ricinus* aus Österreich wurden *B. ventorum* vor *B. divergens* als häufigste *Babesia* sp. identifiziert (Schötta et al. 2017).

#### **4.2.2. *Theileria* spp.**

Zusammen mit den *Babesia* spp. machen *Theileria* spp. die Ordnung der Piroplasmida aus und sie sind ebenfalls obligat intrazelluläre Blutparasiten (Remesar et al. 2019, Fuehrer et al. 2013). Relevanz haben sie in Bezug auf Nutz- und (wilde) Huftiere, die infiziert werden und als Reservoir dienen können (Shaw 2003, Fuehrer et al. 2013). Die verschiedenen Arten werden durch unterschiedliche Spezies der Zeckengattungen *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* und eventuell *Ixodes* übertragen (Remesar et al. 2019, Fuehrer et al. 2013). In einer Studie im Burgenland wurden Rothirsche und Zecken auf *Theileria* spp. untersucht. Alle getesteten Tiere waren infiziert; auch in Zecken der Spezies *H. concinna* wurde DNA des Pathogens gefunden (Fuehrer et al. 2013).

Die Infektion mit diesem Pathogen verläuft vom Grunde her ähnlich wie jene mit Babesien. Unterschiedlich ist allerdings, dass *Theileria* zuerst Leukozyten des Säugetierwirtes infiziert, sich dort vom Sporozoiten zu Merozoiten entwickelt, welche schließlich Erythrozyten befallen



(Weir et al. 2011, Shaw 2003). Ein weiterer Unterschied ist, dass die im Darmepithel der Zecken entstandenen Kineten nicht in die Ovarien migrieren, weswegen es nicht zur transovariellen, sondern nur zur transstadialen Transmission in den Speicheldrüsenzellen kommt (Shaw 2003, Jalovecka et al. 2019). Bisher sind keine zoonotischen Spezies von Theilerien bekannt; je nach Art sind sie jedoch sehr unterschiedlich in ihrer Pathogenität (Yabsley und Shock 2012, Fuehrer et al. 2013).

#### **4.2.3. *Hepatozoon canis***

*Hepatozoon canis* ist der Auslöser der kaninen Hepatozoonose, welche vor allem in Südeuropa vorkommt und in österreichischen Hunden nicht endemisch ist (Baneth et al. 2007, Duscher et al. 2014b). Infektionen können einen asymptomatischen bis lebensbedrohlichen Verlauf nehmen, das Protozoon zeigt aber kein zoonotisches Potential (Baneth et al. 2001, Duscher et al. 2014a). Hauptvektor und auch Endwirt ist die Zeckenart *R. sanguineus* (Duscher et al. 2014b, Baneth et al. 2001). Weitere Zeckengattungen, die im Verdacht stehen auch Vektoren zu sein, sind *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Ixodes* und weitere *Rhipicephalus* spp. (Duscher et al. 2014a, Hodžić et al. 2020). Im Speziellen wurde bereits eine Transmissionsstudie mit Zecken der Art *I. ricinus* gemacht, welche ergab, dass diese nicht als Vektoren tauglich sind, da keine Sporogonie von *H. canis* stattgefunden hat (Giannelli et al. 2013). Zwischenwirte sind Hunde und andere (wilde) Caniden, wie Füchse, Schakale und Wölfe, die auch potentielle Reservoirs für den Erreger sind (Baneth et al. 2001, Najm et al. 2014, Duscher et al. 2013b, Duscher et al. 2014b, Hodžić et al. 2020). Die transstadiale Übertragung des Pathogens wurde bereits beobachtet, aber es gibt keine Hinweise auf die transovarielle Übertragung. *H. canis* kann jedoch vertikal von bereits infizierten Hündinnen auf ihre Welpen übertragen werden (Baneth et al. 2001). Es gibt Hinweise, dass dieser Mechanismus auch bei Füchsen stattfindet (Hodžić et al. 2015a, Duscher et al. 2014a).

Um sich zu infizieren, muss das Tier infizierte Zecken mit reifen Oozysten fressen (Baneth et al. 1998). Die Zecke wird im Verdauungstrakt des Wirts „aufgebrochen“, und die Oozysten werden frei (Baneth et al. 2001). Jede Oozyste enthält Sporozysten, die wiederum infektiöse Sporozoiten beinhalten (Baneth et al. 2007). Die Sporozoiten durchdringen die Darmwand des Tieres, verbreiten sich über Blut und Lymphe im Körper und reichern sich in Zielgeweben, wie Leber, Milz, Nieren und Knochenmark, an. Dort bilden sich aus den Sporozoiten Meronten und Merozoiten, die anschließend Leukozyten infizieren (Baneth et al. 2001, Baneth et al. 2007). In den Leukozyten entwickeln sich die Merozoiten zu Gametozyten, die dann bei der Blutmahlzeit einer Zecke aufgenommen werden. Im Darm der Zecke kommt es zur

Gametogenese, bei welcher Oozysten entstehen (Baneth et al. 1998). Die Sporogonie findet in der Körperhöhle der Zecke, dem Haemocoel, statt (Baneth et al. 1998, Giannelli et al. 2013).

Im Osten Österreichs sind circa 58 % der Füchse positiv auf *H. canis* getestet worden, im Westen waren es fast 30 % (Duscher et al. 2014b, Hodžić et al. 2017b). In benachbarten Ländern konnte *H. canis*-DNA auch in verschiedenen Zeckenarten nachgewiesen werden. In Italien beispielsweise lagen die Infektionsraten zwischen 2,1 bis 8 % (Gabrielli et al. 2010, Dantas-Torres et al. 2012). In einer Studie in der Slowakei und in Tschechien wurden Zecken der Spezies *I. ricinus* gesammelt. In der Slowakei waren von den 5.057 getesteten Zecken 0,08 % positiv, in Tschechien 0,04 % von 2.473 (Hamšíková et al. 2016).

## 5 Molekulare Diagnostikverfahren

In Vorbereitung der molekularen Diagnostikverfahren für den Nachweis der oben beschriebenen Krankheitserreger wurden die Zecken mittels Flagging gesammelt und bei -80 °C eingefroren. Bei dieser Methode wird eine Flagge über die Vegetation gestreift und die darauf gesammelten Zecken anschließend davon abgenommen.

Die Zecken werden dann in 1,5 ml Eppendorf Tubes (Eppendorf Austria GmbH, Österreich) gepoolt. Dafür werden entweder einzelne Zecken, jeweils fünf Adulti oder zehn Nymphen zusammen in ein Tube gegeben und danach gemäß Protokoll in Tab. 1 gewaschen.

Tab. 1: Zecken-Waschanleitung

1 x	Leitungswasser
1 x	3 % Wasserstoffperoxid
2 x	Leitungswasser
1 x	70 % Ethanol
2 x	Leitungswasser
Trocken tupfen mit Papiertüchern	

Anschließend werden die Zeckenpools in 1,5 ml Eppendorf Tubes mit 500 µl nukleasefreiem Wasser und einer Edelstahl-Bead überführt. Diese werden im Tissuelyser II (Quiagen, Deutschland) bei einer Frequenz von 30 Hz für fünf Minuten homogenisiert.

### 5.1. DNA-Extraktion

Die DNA wird mittels dem DNeasy® Blood & Tissue Kit (Quiagen, Deutschland) aus dem Zeckenlysat extrahiert. Dafür wird dieses für einige Sekunden abzentrifugiert, sodass die größeren Stücke absinken und der Überstand entnommen werden kann. Der Überstand wird jeweils mit 180 µl ATL Buffer und 20 µl Proteinase K versetzt und über Nacht bei 56 °C inkubiert.

Nach der Inkubation werden die Tubes gevortext und je 200 µl des AL Buffers und von 99%igem Ethanol hinzu pipettiert und nach jeder Zugabe für 10 - 15 Sekunden gevortext.

Dieses Gemisch wird anschließend auf die zuvor beschriftete Säule der DNeasy® Mini spin columns überführt und für eine Minute bei 8.000 rpm abzentrifugiert. Die Collection Tubes werden inklusive des entstandenen Überstands entsorgt und die Säulen in neue Collection Tubes gesteckt. Die an die Säule gebundene DNA wird mit 500 µl des Puffers AW1 und AW2 gewaschen. Nach dem ersten Puffer werden die Tubes für eine Minute bei 8.000 rpm und nach dem zweiten für drei Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Collection Tubes werden wieder entsorgt und Säulen in davor beschriftete Eppendorf Tubes gesteckt. Auf diese Säulen werden in zwei Schritten, um A- und B-Samples zu erhalten, je 100 µl Elutionspuffer pipettiert, welcher eine Minute bei Raumtemperatur inkubieren muss. Abschließend werden die Säulen für eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert und die eluierte DNA bei -20 °C gelagert.

## **5.2. PCR und Gelelektrophorese**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird für die Amplifikation bestimmter Nukleinsäuresequenzen der DNA verwendet. Hierfür werden Primer, also spezifische Oligonukleotide, die die gewünschte DNA-Sequenz flankieren, verwendet. Nachdem die DNA durch Hitze aufgetrennt wurde, markieren die Primer den Startpunkt der DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase, welche die neuen DNA-Stränge synthetisiert. Auf diese Weise wird mit jedem Zyklus der PCR das anvisierte DNA-Amplikon verdoppelt (Alberts et al. 2008).

Das PCR-Produkt wird dann mittels Gelelektrophorese nach Größe und Ladung aufgetrennt. Um Ergebnisse zu erhalten, wird das Produkt in die Taschen eines Agarosegels pipettiert und das Gel unter Spannung gesetzt. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern in Richtung der Anode und trennen sich dabei ihrer Größe nach auf. Um die Größe der dabei entstandenen Banden bestimmen und feststellen zu können, ob das Gel fertig ist, lässt man einen Ladder mitlaufen. Dieser trennt sich in bereits bekannte Größen auf und macht einen Vergleich möglich. Sichtbar werden die DNA-Banden durch die Färbung mit einem Farbstoff (Alberts et al. 2008).

Für die Durchführung wird ein circa 1,3%iges Agarosegel hergestellt, indem 1,8 g Agarosepulver mit 100 ml 1 x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) und 35 ml Reinstwasser in der Mikrowelle zum Kochen gebracht wird. Nachdem es ein wenig abgekühlt ist, werden 4,2 µl des Farbstoffes Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe GmbH, Deutschland) hinzugefügt und die Flüssigkeit in eine Form mit Kämmen gegossen, wo diese zu einem Gel aushärtet. Die Kämmen werden nach dem Aushärten entfernt. Vor der Beladung des Gels mit den PCR-Produkten, wird es in eine Kammer mit 1 x TBE-Puffer gegeben, dass es bedeckt

ist. Von den PCR-Produkten werden 5 µl in die Taschen des Gels pipettiert. Als Ladder werden 3 µl des Promega Premix 100 bp DNA Ladder (Promega, USA) mit 9 µl PCR-Wasser und 3 µl Blue/Orange 6 x Loading Dye gemischt und ebenfalls auf das Gel aufgetragen.

Ein Gel läuft bei 120 V für etwa 45 Minuten.

### 5.2.1. *Anaplasmataceae*

Mit dieser PCR können sowohl *Anaplasma* spp., als auch *Ehrlichia* spp. mit Hilfe des 16S-Gens nachgewiesen werden. Dafür wird das folgende Protokoll angewendet (Parola et al. 2000):

Tab. 2: Primer für den *Anaplasmataceae*-Nachweis

Forward Primer	EHR16SD_for	5'- GGT ACC YAC AGA AGA AGT CC -3'
Reverse Primer	EHR16SR_rev	5'- TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC -3'

Tab. 3: Mastermix für den *Anaplasmataceae*-Nachweis

Reagens	Menge [µl]	
	1 Reaktion	100 Reaktionen
Wasser	11,175	1117,5
5 x Green Reaction Buffer	5	500
dNTP's (25 mM)	0,2	20
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5	150
TaqPolymerase (GoTaq) 5 u/µl	0,125	12,5
Primer (25 pmol/µl)	1	100
Primer (25 pmol/µl)	1	100
Template	5	100 x 5 µl
Gesamt	25	2500

Tab. 4: Temperaturprofil für den *Anaplasmataceae*-Nachweis

95 °C	2 min	Initiale Denaturierung
94 °C	1 min	35 x
54 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	5 min	Finale Elongation
15 °C	Aufbewahrung	

Das PCR-Produkt hat eine erwartete Länge von 345 bp (Parola et al. 2000).

### 5.2.2. *Rickettsia* spp.

Für die Detektion von *Rickettsia* spp. kommen zwei PCR-Protokolle zur Anwendung. Die erste PCR ist ein Screening aller Proben, bei welchem das Gen *gltA* für ein mitochondriales Protein, der Citratsynthase, amplifiziert wird (Regnery et al. 1991). Die positiv getesteten Proben werden dann ein zweites Mal getestet, und zwar auf das Gen des Outer membrane protein A (OmpA) für das gleichnamige Oberflächenprotein, um die *Rickettsia*-Arten der spotted fever group (SFG, Fleckfieber-Gruppe) differenzieren zu können (Roux et al. 1996). Mit dem nachstehenden Protokoll für die Screening-PCR wird eine Produktlänge von circa 381 bp erwartet (Regnery et al. 1991):

Tab. 5: Primer der *Rickettsia* spp.-Screening-PCR

Forward Primer	RpCS.877p	5' - GGGGGCCTGCTCACGGCGG -3'
Reverse Primer	RpCS.1258n	5' - ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA -3'

Tab. 6: Mastermix der *Rickettsia* spp.-Screening-PCR

Reagens	Menge [ $\mu$ l]	
	1 Reaktion	10 Reaktionen
Wasser	12,675	126,75
5 x Green Reaction Buffer	5	50
dNTP's (25 mM)	0,2	2
TaqPolymerase (GoTaq) 5 u/ $\mu$ l	0,125	1,25
Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1	10
Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1	10
Template	5	10 x 5 $\mu$ l
Gesamt	25	250

Tab. 7: Temperaturprofil der *Rickettsia* spp.-Screening-PCR

95 °C	5 min	Initiale Denaturierung
95 °C	30 sec	35 x - 40 x
50 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	Finale Elongation
15 °C	Aufbewahrung	

Das PCR-Protokoll für die zuvor positiv getesteten Proben ergibt ein circa 632 bp langes PCR-Produkt und sieht wie folgt aus (Roux et al. 1996):

Tab. 8: Primer der SFG-*Rickettsia* spp.-PCR

Forward Primer	Rr190-70	5' - ATGGCGAATATTTCTCCAAA -3'
Reverse Primer	Rr190-701	5' - GTTCCGTTAATGGCAGCATCT -3'

Tab. 9: Mastermix der SFG-*Rickettsia* spp.-PCR

Reagens	Menge [µl]	
	1 Reaktion	10 Reaktionen
Wasser	12,675	126,75
5 x Green Reaction Buffer	5	50
dNTP's (25 mM)	0,2	2
TaqPolymerase (GoTaq) 5 u/µl	0,125	1,25
Primer (10 pmol/µl)	1	10
Primer (10 pmol/µl)	1	10
Template	5	10 x 5 µl
Gesamt	25	250

Tab. 10: Temperaturprofil der SFG-*Rickettsia* spp.-PCR

94 °C	5 min	Initiale Denaturierung
94 °C	30 sec	35 x - 40 x
47 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	Finale Elongation
15 °C	Aufbewahrung	



### 5.2.3. *Francisella tularensis*

Der Nachweis von *F. tularensis* wird mittels 17-kDa Lipoprotein Gen durchgeführt. Das PCR-Produkt hat eine ungefähre Länge von 400 bp (Sjöstedt et al. 1997):

Tab. 11: Primer der *F. tularensis*-Detektion

Forward Primer	TUL4-435	5'- GCTGTATCATCATTTAATAAACTGCTG -3'
Reverse Primer	TUL4-863	5'- TTGGGAAGCTTGTATCATGGCACT -3'

Tab. 12: Mastermix der *F. tularensis*-Detektion

Reagens	Menge [ $\mu$ l]	
	1 Reaktion	10 Reaktionen
Wasser	12,675	126,75
5 x Green Reaction Buffer	5	50
dNTP's (25 mM)	0,2	2
TaqPolymerase (GoTaq) 5 u/ $\mu$ l	0,125	1,25
Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1	10
Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1	10
Template	5	10 x 5 $\mu$ l
Gesamt	25	250

Tab. 13: Temperaturprofil der *F. tularensis*-Detektion

94 °C	5 min	Initiale Denaturierung
94 °C	1 min	35 x - 40 x
51 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	Finale Elongation
15 °C	Aufbewahrung	

#### 5.2.4. *Borrelia burgdorferi*

Diese PCR weist mit dem folgenden Protokoll *Borrelia* spp. allgemein nach. Das Produkt hat eine Länge von 674 bp. Hierbei wird das 16S rRNA-Gen für die Identifikation verwendet (Liebisch et al. 1998):

Tab. 14: Primer des *Borrelia*-Nachweises

Forward Primer	Borr_allg_for	5'- ACG CTG GCA GTG CGT CTT AA -3'
Reverse Primer	Borr_allg_rev	5'- CTG ATA TCA ACA GAT TCC ACC C -3'

Tab. 15: Temperaturkurve des *Borrelia*-Nachweises

94 °C	5 min	Initiale Denaturierung
94 °C	1,5 min	40 x
63 °C	2 min	
72 °C	2 min	
72 °C	10 min	Finale Elongation
15 °C	Aufbewahrung	

Tab. 16: Mastermix des *Borrelia*-Nachweises

Reagens	Menge [ $\mu$ l]	
	1 Reaktion	100 Reaktionen
Wasser	12,675	1267,5
5 x Green Reaction Buffer	5	500
dNTP's (25 mM)	0,2	20
TaqPolymerase (GoTaq) 5 u/ $\mu$ l	0,125	12,5
Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1	100
Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1	100
Template	5	100 x 5 $\mu$ l
Gesamt	25	2500

### 5.2.5. *Bartonella* spp.

Auch für die Detektion von *Bartonella* spp. wird zuerst eine Screening-PCR, die die 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer (ITS) Region amplifiziert, mit allen Proben gemacht. Die Größe des PCR-Produkts kann zwischen 500 und 800 bp liegen (Diniz et al. 2007). Anschließend wird eine weitere PCR mit den positiven Proben gemacht, die das Gen *gltA*, welches für die Citratsynthase kodiert, vervielfacht. So wird die Spezifität für *Bartonella henselae* und *Bartonella*-ähnliche Isolate erhöht, um eventuell falsch-positive Ergebnisse ausschließen zu können. Das PCR-Produkt ist ungefähr 379 bp lang (Norman et al. 1995):

Tab. 17: Primer der *Bartonella*-Screening-PCR

Forward Primer	BA325s	5' - CTTCAGATGATGATCCCAAGCCTTYTGGCG -3'
Reverse Primer	BA1100as	5' - GAACCGACGACCCCCTGCTTGCAAAGCA -3'

Tab. 18: Mastermix der *Bartonella*-Screening-PCR

Reagens	Menge [ $\mu$ l]	
	1 Reaktion	10 Reaktionen
Wasser	12,675	126,75
5 x Green Reaction Buffer	5	50
dNTP's (25 mM)	0,2	2
TaqPolymerase (GoTaq) 5 u/ $\mu$ l	0,125	1,25
Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1	10
Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1	10
Template	5	10 x 5 $\mu$ l
Gesamt	25	250

Tab. 19: Temperaturprofil der *Bartonella*-Screening-PCR

95 °C	5 min	Initiale Denaturierung
95 °C	30 sec	35 x - 40 x
66 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	Finale Elongation
15 °C	Aufbewahrung	

Tab. 20: Primer der PCR der *gltA*-PCR

Forward Primer	BhCS.781p	5'- GGGGACCAGCTCATGGTGG -3'
Reverse Primer	BhCS.1137n	5'- AATGCAAAAAGAACAGTAAACA -3'

Tab. 21: Mastermix der PCR der gltA-PCR

Reagens	Menge [ $\mu$ l]	
	1 Reaktion	10 Reaktionen
Wasser	12,675	126,75
5 x Green Reaction Buffer	5	50
dNTP's (25 mM)	0,2	2
TaqPolymerase (GoTaq) 5 u/ $\mu$ l	0,125	1,25
Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1	10
Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1	10
Template	5	10 x 5 $\mu$ l
Gesamt	25	250

Tab. 22: Temperaturprofil der PCR der gltA-PCR

94 °C	5 min	Initiale Denaturierung
94 °C	1 min	35 x - 40 x
54 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	Finale Elongation
15 °C	Aufbewahrung	

### 5.2.6. Apicomplexa

*Babesia* spp., *Theileria* spp. und *Hepatozoon canis* können mit denselben Primern nachgewiesen werden. Hierfür wird das 18S rRNA Gen anvisiert. Im Unterschied zu den anderen, handelt es sich bei dieser PCR um eine nested PCR. Nach der ersten PCR, der Nest

1 PCR, wird deren PCR-Produkt als Template für die Nest 2 PCR verwendet. Hierfür werden zwei verschiedene Mastermixes und Temperaturprofile verwendet. Dadurch wird das Signal der ersten PCR verstärkt, wobei nur das Produkt der Nest 2 auch auf ein Gel zur Elektrophorese geladen wird. Das Endprodukt der Nest 2 PCR hat eine Länge von 561 bp (Zintl et al. 2011):

Tab. 23: Primer der Nest 1 PCR

Forward Primer	BTH-1F	5'- CCT GAG AAA CGG CTA CCA CAT CT -3'
Reverse Primer	BTH-1R	5'- TTG CGA CCA TAC TCC CCC CA -3'

Tab. 24: Mastermix der Nest 1 PCR

Reagens	Menge [ $\mu$ l]	
	1 Reaktion	100 Reaktionen
Wasser	14,175	1417,5
5 x Green Reaction Buffer	5	500
dNTP's (25 mM)	0,2	20
TaqPolymerase (GoTaq) 5 u/ $\mu$ l	0,125	12,5
Primer (100 pmol/ $\mu$ l)	0,25	25
Primer (100 pmol/ $\mu$ l)	0,25	25
Template	5	100 x 5 $\mu$ l
Gesamt	25	2500

Tab. 25: Temperaturprofil der Nest 1 PCR

94 °C	2 min	Initiale Denaturierung
95 °C	30 sec	40 x
68 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	Finale Elongation
15 °C	Aufbewahrung	

Tab. 26: Primer der Nest 2 PCR

Forward Primer	G-2_for	5'- GTC TTG TAA TTG GAA TGA TGG -3'
Reverse Primer	G-2_rev	5'- CCA AAG ACT TTG ATT TCT CTC -3'

Tab. 27: Mastermix der Nest 2 PCR

Reagens	Menge [ $\mu$ l]	
	1 Reaktion	100 Reaktionen
Wasser	13,675	1367,5
5 x Green Reaction Buffer	5	500
dNTP's (25 mM)	0,2	20
TaqPolymerase (GoTaq) 5 u/ $\mu$ l	0,125	12,5
Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5	50
Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5	50
Template	5	100 x 5 $\mu$ l
Gesamt	25	2500

Tab. 28: Temperaturprofil der Nest 2 PCR

94 °C	2 min	Initiale Denaturierung
95 °C	30 sec	40 x
60 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	Finale Elongation
15 °C	Aufbewahrung	



## 6. Diskussion

In einer im Jahr 2017 am Institut für Parasitologie durchgeführten Studie wurden Blutproben von 49 Militärhunden aus Kaisersteinbruch auf verschiedene Parasiten und Bakterien untersucht (Graf 2017). Dabei stellte sich heraus, dass 95,9 % der Hunde schon einmal in Kontakt mit *Borrelia* spp. gekommen waren, da sie Antikörper dagegen aufwiesen. Es wurden allerdings keine Proben mittels PCR positiv auf Borrelien getestet. In Europa liegt die Seroprävalenz von Hunden zwischen 3,9 und 35,5 %, wobei in Österreich eine höhere Prävalenz zwischen 38 und 59 % festgestellt wurde (Leschnik et al. 2010). Der Vergleich zu einer anderen Studie zeigte, dass der Prozentsatz von Antikörper-positiven Hunden in Österreich in einem Bereich von 4,3 % und 5,6 % lag (Pantchev et al. 2015). Diese Divergenzen könnten sich durch verschiedene Sammelorte, eine unterschiedliche Anzahl getesteter Proben und verschiedene Testverfahren erklären. *Borrelia burgdorferi* s.l. wurden dabei eher in den Bundesländern Wien, Niederösterreich, Oberösterreich, Kärnten und Tirol gefunden (Pantchev et al. 2015).

Im Zuge der Untersuchungen von Graf (2017) wurden 12,2 % der Proben positiv auf *Babesia canis* getestet. Laut Pantchev et al. (2015) sind rund 7,8 % der Hunde in Österreich seropositiv auf Babesien, gehäuft im Osten Österreichs. In Rumänien wurden 96 Hunde auf *Babesia* spp. untersucht, wobei sich herausstellte, dass circa 30 % der Hunde positiv waren (Andersson et al. 2017). Die geografische Verteilung dieses Pathogens ist stark abhängig vom Vorhandensein kompetenter Vektoren, bei welchen es sich zumeist um *R. sanguineus* und *D. reticulatus* handelt, wodurch auffällige regionale Unterschiede zu beobachten sind (Solano-Gallego et al. 2016, Andersson et al. 2017).

Die Testung auf *Anaplasma* spp., *Bartonella* spp. und *H. canis* mittels PCR fiel bei allen Erregern in der Studie von Graf (2017) negativ aus. In Bezug auf Österreich wurde dokumentiert, dass ungefähr 16 % der getesteten Hunde positiv auf *A. phagocytophilum* waren. Präsent ist dieser Krankheitserreger hauptsächlich in den Bundesländern Wien, Niederösterreich, Oberösterreich, Kärnten, Vorarlberg, Steiermark und Burgenland (Pantchev et al. 2015). Eine italienische Studie kam zu dem Ergebnis, dass die Seroprävalenz von *Bartonella* spp. bei Hunden zwischen 6 und 28,3 % liegt, sowie 11,6 % der mittels PCR getesteten Hundebloodproben positiv waren (Álvarez-Fernández et al. 2018). Für Österreich sind keine Daten bezüglich *Bartonella*-Antikörpern in Hunden bekannt. Beim Menschen hingegen gibt es Studien zu diesem Thema: In Ostösterreich wurden bei circa 23 % der

Blutspender Antikörper gegen *Bartonella* spp. gefunden (Müller et al. 2016). *H. canis* ist in österreichischen Hunden nicht endemisch und es gibt keine Daten zu Infektionen, allerdings ist ein signifikanter Teil, nämlich 58,3 %, der Fuchspopulation in Österreich infiziert (Duscher et al. 2014b). Auch in Deutschland und Bosnien und Herzegowina wurde ein Teil der wilden Caniden positiv auf diesen Erreger getestet. In Deutschland waren 46 % der Tests bei Wölfen, in Bosnien und Herzegowina 38,6 % bei Rotfüchsen positiv (Hodžić et al. 2020, Hodžić et al. 2015a).

Zu den in Kapitel 4 der vorliegenden Bachelorarbeit behandelten *Rickettsia* spp., *F. tularensis* und *Theileria* spp. waren keine wissenschaftlichen Veröffentlichungen verfügbar, die sich mit Seroprävalenzen oder PCR-Testungen befassen; sie waren auch nicht Thema der Studie von Graf aus dem Jahr 2017. In einer Studie von Schötta et al. (2017) wurden in Tirol allerdings 1.200 menschliche Blutspender getestet. 7,7 % davon hatten Antikörper gegen Rickettsien.

Allgemein wurde festgestellt, dass die Frequenz von seropositiven Hunden in Spanien im Sommer steigt, was auf eine erhöhte Aktivität der Vektorzeckenspezies zurückzuführen ist (Dantas-Torres et al. 2012). In den USA wurde bei 87 Hunden eine Infektion mit *F. tularensis* mittels Antikörpertest festgestellt (Kwit et al. 2020). Für Österreich sind dazu keine epidemiologischen Daten verfügbar, allerdings sind Infektionsherde im Osten des Landes bekannt (AGES). Dem derzeitigen Stand der Forschung nach werden Hunde nicht von Theilerien befallen. Jedoch wurde bei Rothirschen in einem Wildgehege in Ostösterreich festgestellt, dass alle der untersuchten Tiere mit *Theileria* infiziert waren (Fuehrer et al. 2013).

Von Zecken übertragene Krankheiten gewinnen zunehmend an Bedeutung, da sie immer häufiger vorkommen und sich durch ihre Vektoren auch in neue Gebiete ausbreiten. Beeinflusst wird die Migration durch die Veränderung des Klimas (Estrada-Peña et al. 2012, Namina et al. 2019). So werden aufgrund der Erderwärmung immer häufiger nicht heimische Zeckenarten in neuen Regionen aufgefunden, wie beispielsweise *R. sanguineus* in Österreich. Als weitere Folge der Erwärmung breiten sich bereits etablierte Zeckenspezies in höheren Lagen (Seehöhe) aus und damit auch die von ihnen getragenen Pathogene (Duscher et al. 2014a, Namina et al. 2019). Interessant im Zusammenhang mit Temperatur und dem Überleben von Zecken ist auch die Vermutung, dass die Infektion von Zecken mit bestimmten Pathogenen zur Erhöhung ihrer Resistenz gegenüber Kälte oder Austrocknung, und damit zu einem veränderten Verhalten der Zecke führt (Lejal et al. 2019). Allerdings hat nicht nur das Klima Einfluss auf die Zeckenpopulationen, sondern können sich auch dramatische

Naturereignisse, wie die Überflutung eines Gebiets und deren Folgen, langfristig und nachhaltig darauf auswirken (Weiler et al. 2017). Besonders die saisonale Aktivität von Zecken kann ein wichtiger Indikator für die Vorhersage des Vorkommens unterschiedlicher Zecken und ihrer Erreger sein und so zur Prävention von Erkrankungen genützt werden (Duscher et al. 2013a).

In vielen der vorliegenden Arbeit zugrunde gelegten Studien wurden Koinfektionen von Zecken mit zwei oder mehr Pathogenen beschrieben. Ein wichtiger Ansatzpunkt für die Wissenschaft ist das Zusammenspiel beziehungsweise die Interaktion der Pathogene miteinander und mit der Zecke als Vektor beziehungsweise Wirt näher zu erforschen und zu entschlüsseln. Koinfektionen sind keine Seltenheit und können auch Pathogen-übergreifend auftreten (Hodžić et al. 2017b, Leschnik et al. 2012, Schötta et al. 2017). In diesem Zusammenhang wurde beispielweise beobachtet, dass die Infektion einer Zecke mit zwei verschiedenen Genospezies des *B. burgorferi* s.l.-Komplexes je nach Kombinationen eine fördernde oder hemmende Wirkung auf das Wachstum der Bakterien haben kann (Schötta et al. 2017). Koinfektionen können unterschiedliche Auswirkungen auf die Pathogenität der einzelnen Erreger sowohl bei der übertragenden Zecke, als auch bei Infizierten oder Erkrankten haben (Schötta et al. 2017, Álvarez-Fernández et al. 2018, Pantchev et al. 2015).

Zu den eher kontrovers diskutierten Themen, die noch weiter erforscht werden müssen, zählen das Vektorpotential von bestimmten Zecken und Impfungen. In Bezug auf das Vektorpotential ist zu berücksichtigen, dass nicht jede Zecke, die positiv auf die DNA eines Erregers getestet wurde, automatisch in der Lage ist, das Pathogen auch weiterzugeben. So gibt es keine Beweise für die Rolle von Zecken bei der Übertragung von *Bartonella* spp. und ihrer Beteiligung bei der Infektion von Menschen (Müller et al. 2016, Regier et al. 2019). Auch die Annahme, dass Zecken der Spezies *I. ricinus* Vektoren für *H. canis* sein könnten, wurde mittlerweile im Laufe einer Transmissionsstudie für eher unwahrscheinlich erklärt (Giannelli et al. 2013).

Dies sind nur zwei Beispiele für ungeklärte Vektorkapazität. Dazu wären noch einige Studien notwendig, um zweifelsfrei nachzuweisen, welche Zecken Vektoren für welche Krankheitserreger sind. Es ist davon auszugehen, dass dies in der Praxis nicht einfach umzusetzen sein wird, da es eine Vielzahl von Vektoren und Pathogenen gibt. Da sich diese auch weiterentwickeln, ist nicht einmal auszuschließen, dass sie sich künftig vielleicht doch in bestimmten Vektoren etablieren könnten.

Gegen einige der diskutierten Pathogene gibt es bereits Impfungen, wenngleich manche davon umstritten sind. So sind beispielsweise die wissenschaftlichen Meinungen zur *Borrelia*-Impfung kontrovers, zumal noch kein Nachweis für viele der Genospezies von *B. burgdorferi* s.l. vorhanden ist, ob sie überhaupt Infektionen bei Hunden auslösen. Strittig ist auch, ob ein absoluter Schutz gegen eine Infektion mit *B. burgdorferi* s.l. möglich ist, da die Impfungen mit einer oder wenigen Genospezies hergestellt wird und somit möglicherweise nicht gegen alle schützend wirkt (Pantchev et al. 2015). Dies trifft ebenso auf Impfungen gegen andere Erreger zu, weswegen auf diesem Gebiet noch viel Forschungsarbeit nötig sein wird.

Bei der Eindämmung von durch Zecken übertragenen Krankheiten bei Tieren und Menschen werden somit die Beforschung von Koinfektionen und des Vektorpotentials, sowie die Entwicklung von Impfungen eine zentrale Rolle spielen müssen.

## 7. Zusammenfassung

Ein für das österreichische Bundesheer durchgeführtes Pathogen-Screening bei Militärhunden war Anstoß für das Projekt zur Untersuchung von Zecken in dem Gebiet von Kaisersteinbruch. Zecken sind generell in großer Zahl in Österreich vorhanden und stellen eine wichtige Quelle der Übertragung einiger Krankheitserreger auf Mensch und Tier dar. Im Rahmen dieser Bachelorarbeit sollten ursprünglich gesammelte Zecken auf die folgenden Erreger getestet werden: *Anaplasmataceae*, *Rickettsia* spp., *Francisella tularensis*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Bartonella* spp., *Babesia* spp., *Theileria* spp. und *Hepatozoon canis*.

Aufgrund der COVID-19-bedingten Maßnahmen musste allerdings von einer praktischen Arbeit abgesehen und zu einer Literaturliteratur gewechselt werden, in der sowohl auf die gesammelten Zeckenspezies, als auch auf die Pathogene, die getestet werden sollten, eingegangen wird. Diese Zeckenarten umfassen *Ixodes ricinus*, *Ixodes inopinatus*, *Dermacentor reticulatus*, *Haemaphysalis concinna* und *Haemaphysalis inermis*.

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die Beschreibung der Eigenschaften sowohl der Zeckenarten, als auch der Pathogene, sowie ihrer Besonderheiten, deren Verbreitung und ihrer Bedeutung für Mensch und Tier, mit Hauptaugenmerk auf Hunden. Eingegangen wird insbesondere auf den Lebenszyklus, die Infektionsmechanismen der Krankheitserreger und die Infektionsraten bei Zecken anhand der dazu verfügbaren Literatur.

Auf die ursprünglich angedachten molekulardiagnostischen Verfahren, DNA-Extraktion und PCR-Nachweis, wird theoretisch eingegangen. In der Diskussion werden wissenschaftliche Publikationen mit einer Vorgängerstudie aus dem Jahr 2017, die ähnliche Inhalte behandelt und ebenfalls am Institut für Parasitologie durchgeführt worden war, verglichen.

## 8. Summary

The underlying reason for this study on examining ticks in the area of Kaisersteinbruch was a pathogen screening in military dogs conducted for the Austrian Armed Forces. Ticks generally occur frequently in Austria and pose an important cause of pathogen transmission to humans and animals. The initial goal of this bachelor thesis was the planned testing of collected ticks for the presence of the following pathogens: *Anaplasmataceae*, *Rickettsia* spp., *Francisella tularensis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Bartonella* spp., *Babesia* spp., *Theileria* spp., and *Hepatozoon canis*.

Based on the fact that measures had to be taken in connection with COVID-19 I had to abstain from a laboratory study and had to switch to a literature-based thesis, in which both the originally collected tick species as well as the pathogens that should have been tested for are elaborated. These tick species include *Ixodes ricinus*, *Ixodes inopinatus*, *Dermacentor reticulatus*, *Haemaphysalis concinna* and *Haemaphysalis inermis*.

The present thesis contains a description of the properties of the tick species and the pathogens as well as some of their more distinctive features, their distribution, and their relevance for humans and animals with the main focus on dogs. Moreover, it deals with the life cycle and mechanisms of infection of the pathogens and the infection rates in ticks by means of available literature.

The initially projected molecular diagnostic methods, namely DNA extraction and PCR detection, are thus solely approached in a theoretical way. Scientific publications are compared to a study previously conducted in the year 2017 at the Institute of Parasitology that covers similar contents in the discussion part of this thesis.

## 9. Literaturverzeichnis

- Álvarez-Fernández A, Breitschwerdt EB, Solano-Gallego L. 2018. *Bartonella* infections in cats and dogs including zoonotic aspects. *Parasites & Vectors*, 11, 624.
- Andersson MO, Tolf C, Tamba P, Stefanache M, Waldenström J, Dobler G, Chitimia-Dobler L. 2017. Canine tick-borne diseases in pet dogs from Romania. *Parasites & Vectors*, 10, 155.
- Baneth G, Shkap V, Samish M, Pipano E, Savitsky I. 1998. Antibody response to *Hepatozoon canis* in experimentally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, 74(2-4):299-305.
- Baneth G, Samish M, Alekseev E, Aroch I, Shkap V. 2001. Transmission of *hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *J Parasitol.* 87(3):606-611.
- Baneth G, Samish, Shkap V. 2007. Life cycle of *Depatozoon canis* (apicomplexa: adeleorina: hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*canis familiaris*). *J Parasitol.* 93(3):283-299.
- Cardoso L, Gilad M, Cortes HCE, Nachum-Biala Y, Lopes AP, Vila-Viçosa MJ, Simões M, Rodrigues PA, Baneth G. 2015. First report of *Anaplasma platys* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) and molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* in foxes from Portugal. *Parasites & Vectores*, 8, 144.
- Celli J, Zahrt TC. 2013. Mechanisms of *Francisella tularensis* Intracellular Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 3(4):a010314.
- Chitimia-Dobler L, Rieß R, Kahl O, Wölfel S, Dobler G, Nava S, Estrada-Peña A. 2018. *Ixodes inopinatus* - Occurring also outside the Mediterranean region. *Ticks Tick Borne Diseases*, 9(2):196-200.
- Dahmani M, Davoust B, Tahir D, Raoult D, Fenollar F, Mediannikov O. 2017. Molecular investigation and phylogeny of *Anaplasmataceae* species infecting domestic animals and ticks in Corsica, France. *Parasites & Vectores*, 10, 302.
- Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D. 2012. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective [published correction appears in *Trends Parasitol.* 2013 Oct;29(10):516]. *Trends Parasitology*, 28(10):437-446.

- Dantas-Torres F, Latrofa MS, Weigl S, Tarallo VD, Lia RP, Otranto D. 2012. *Hepatozoon canis* infection in ticks during spring and summer in Italy. *Parasitol Res*, 110(2):695-698.
- Davidson MM, Evans R, Ling CL, Wiseman AD, Joss AWL, Ho-Yen DO. 1999. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from ticks in the Highlands of Scotland. *J Med Microbiol.*, 48(1):59-65.
- Deng H, Le Rhun D, Buffet JR, Cotté V, Read A, Birtles RJ, Vayssier-Taussat M. 2012. Strategies of exploitation of mammalian reservoirs by *Bartonella* species. *Veterinary Research*, 43, 15.
- Diniz PP, Maggi RG, Schwartz DS, Cadenas MB, Bradley JM, Hegarty B, Breitschwerdt EB. 2007. Canine bartonellosis: serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. *Veterinary Research*, 38(5):697-710.
- Duscher GG, Feiler A, Leschnik, M, Joachim A. 2013a. Seasonal and spatial distribution of ixodid tick species feeding on naturally infested dogs from Eastern Austria and the influence of acaricides/repellents on these parameters. *Parasites & Vectors*, 6, 76.
- Duscher GG, Kübber-Heiss A, Richter B, Suchentrunk F. 2013b. A golden jackal (*Canis aureus*) from Austria bearing *Hepatozoon canis*--import due to immigration into a non-endemic area?. *Ticks Tick Borne Diseases*, 4(1-2):133-137.
- Duscher GG, Leschnik M, Fuehrer HP, Joachim A. 2014a. Wildlife reservoirs for vector-borne canine, feline and zoonotic infections in Austria. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4, 88 - 96.
- Duscher GG, Fuehrer HP, Kübber-Heiss A. 2014b. Fox on the run – molecular surveillance of fox blood and tissue for the occurrence of tick-borne pathogens in Austria. *Parasites & Vectors*, 7, 521.
- Duscher GG, Hodžić A, Weiler M, Vaux AGC, Rudolf I, Sixl W, Medlock JM, Versteirt V, Hubálek Z. 2016. First report of *Rickettsia raoultii* in field collected *Dermacentor reticulatus* ticks from Austria. *Ticks Tick Borne Diseases*, 7(5):720-722.
- Duscher GG, Hodžić A, Hufnagl P, Wille-Piazzai W, Schötta AM, Markowicz MA, Estrada-Peña A, Stanek G, Allerberger F. 2018. Adult *Hyalomma marginatum* tick positive for *Rickettsia aeschlimannii* in Austria, October 2018. *Eurosurveill.*, 23(48):pii=1800595.



- Estrada-Peña A, Ayllón N, de la Fuente J. 2012. Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission. *Frontiers in Physiology*, 3, 64.
- Estrada-Peña A, Nava S, Petney T. 2014. Description of all the stages of *Ixodes inopinatus* n. sp. (Acari: Ixodidae). *Ticks Tick Borne Diseases*, 5(6):734-743.
- Fukumoto S, Suzuki H, Igarashi I, Xuan X. 2005. Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *International Journal for Parasitology*, 35(9):1031-1035.
- Fuehrer HP, Biro N, Harl J, Worliczek HL, Beiglböck C, Farkas R, Joachim A, Duscher GG. 2013. Molecular detection of *Theileria* sp. ZS TO4 in red deer (*Cervus elaphus*) and questing *Haemaphysalis concinna* ticks in Eastern Austria. *Veterinary Parasitology*, 197(3-4):653-657.
- Gabrielli S, Kumlien S, Calderini P, Brozzi A, Iori A, Cancrini G. 2010. The first report of *Hepatozoon canis* identified in *Vulpes vulpes* and ticks from Italy. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 10(9):855-859.
- Giannelli A, Ramos RA, Dantas-Torres F, Mencke N, Baneth G, Otranto D. 2013. Experimental evidence against transmission of *Hepatozoon canis* by *Ixodes ricinus*. *Ticks Tick Borne Diseases*, 4(5):391-394.
- Graf B. 2017. Parasiten und vektorübertragene Erreger bei Militärhunden. Veterinärmedizinische Universität Wien.
- Hamšíková Z, Silaghi C, Rudolf I, Venclíková K, Mahríková L, Slovák M, Mendel J, Blažejová H, Berthová L, Kocianová E, Hubálek Z, Schnittger L, Kazimírová M. 2016. Molecular detection and phylogenetic analysis of *Hepatozoon* spp. in questing *Ixodes ricinus* ticks and rodents from Slovakia and Czech Republic. *Parasitol Res.*, 115(10):3897-3904.
- Hauck D, Springer A, Pachnicke S, Schunack B, Fingerle V, Strube C. 2019. *Ixodes inopinatus* in northern Germany: occurrence and potential vector role for *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., and *Anaplasma phagocytophilum* in comparison with *Ixodes ricinus*. *Parasitology Research*, 118, 3205–3216.
- Hodžić A, Alić A, Fuehrer HP, Harl J, Wille-Piazzai W, Duscher GG. 2015a. A molecular survey of vector-borne pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Bosnia and Herzegovina. *Parasites & Vectors*, 8, 88.

- Hodžić A, Cézanne R, Duscher GG, Harl J, Glawischnig W, Fuehrer HP. 2015b. *Candidatus* Neoehrlichia sp. in an Austrian fox is distinct from *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis, but closer related to *Candidatus* Neoehrlichia lotoris. Parasites & Vectors, 8, 539.
- Hodžić A, Zörer J, Duscher GG. 2017a. *Dermacentor reticulatus*, a putative vector of *Babesia* cf. *microti* (syn. *Theileria annae*) piroplasm. Parasitol Res., 116(3):1075-1077.
- Hodžić A, Mrowietz N, Cézanne R, Bruckschwaiger P, Punz S, Habler VE, Tomsik V, Lazar J, Duscher GG, Glawischnig W, Fuehrer HP. 2017b. Occurrence and diversity of arthropod-transmitted pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) in western Austria, and possible vertical (transplacental) transmission of *Hepatozoon canis*. Parasitology, 145(3):335-344.
- Hodžić A, Mateos-Hernández L, Leschnik M, Alberdi P, Rego ROM, Contreras M, Villar M, de la Fuente J, Cabezas-Crus A, Duscher GG. 2019. Tick Bites Induce Anti- $\alpha$ -Gal Antibodies in Dogs. Vaccines (Basel), 7(3):114.
- Hodžić A, Georges I, Postl M, Duscher GG, Jeschke D, Szentiks CA, Ansorge H, Heddergott M. 2020. Molecular survey of tick-borne pathogens reveals a high prevalence and low genetic variability of *Hepatozoon canis* in free-ranging grey wolves (*Canis lupus*) in Germany. Ticks Tick Borne Diseases, 11(3):101389.
- Hornok S, Kováts D, Csörgő T, Meli ML, Gönczi E, Hadnagy Z, Takács N, Farkas R, Hofmann-Lehmann R. 2014. Birds as potential reservoirs of tick-borne pathogens: first evidence of bacteraemia with *Rickettsia helvetica*. Parasites & Vectors, 7, 128.
- Hornok S, Kováts D, Horváth G, Kontschán J, Farkas R. 2019. Checklist of the hard tick (Acari: Ixodidae) fauna of Hungary with emphasis on host-associations and the emergence of *Rhipicephalus sanguineus*. Experimental and Applied Acarology, 80, 311–328.
- Jalovecka M, Sojka D, Ascencio M, Schnittger L. 2019. Babesia Life Cycle - When Phylogeny Meets Biology. Trends in Parasitology, 35(5):356-368.
- Kiewra D, Czułowska A, Dyczko D, Zieliński R, Plewa-Tutaj K. 2019. First record of *Haemaphysalis concinna* (Acari: Ixodidae) in Lower Silesia, SW Poland. Experimental and Applied Acarology, 77, 449–454.

- Kwit NA, Middaugh NA, VinHatton ES, Melman SD, Onischuk L, Aragon AS, Nelson CA, Mead PS, Etestad PJ. 2020. *Francisella tularensis* infection in dogs: 88 cases (2014-2016). J Am Vet Med Assoc., 256(2):220-225.
- Latif AA, Putterill JF, de Klerk DG, Pienaar R, Mans BJ. 2012. *Nuttalliella namaqua* (Ixodoidea: Nuttalliellidae): first description of the male, immature stages and re-description of the female. PLoS One, 7(7):e41651.
- Lejal E, Marsot M, Chalvet-Monfray K, Cosson JF, Moutailler S, Vayssier-Taussat, Pollet T. 2019. A three-years assessment of *Ixodes ricinus*-borne pathogens in a French peri-urban forest. Parasites & Vectors, 12, 551.
- Leschnik MW, Kirtz G, Khanakah G, Duscher G, Leidinger E, Thalhammer JG, Joachim A, Stanek G. 2010. Humoral immune response in dogs naturally infected with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and in dogs after immunization with a *Borrelia* vaccine. Clinical and Vaccine Immunology, 17(5):828-835.
- Leschnik MW, Khanakah G, Duscher G, Wille-Piazzai W, Hörweg C, Joachim A, Stanek G. 2012. Species, developmental stage and infection with microbial pathogens of engorged ticks removed from dogs and questing ticks. Medical and Veterinary Entomology, 26, 440-446.
- Liebisch G, Sohns B, Bautsch W. 1998. Detection and typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks attached to human skin by PCR. Journal of Clinical Microbiology, 36(11):3355-3358.
- Müller A, Reiter M, Schötta AM, Stockinger H, Stanek G. 2016. Detection of *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* ticks and *Bartonella* seroprevalence in human populations. Ticks Tick Borne Diseases, 7(5):763-767.
- Najm NA, Meyer-Kayser E, Hoffmann L, Pfister K, Silaghi C. 2014. *Hepatozoon canis* in German red foxes (*Vulpes vulpes*) and their ticks: molecular characterization and the phylogenetic relationship to other *Hepatozoon* spp. Parasitol Res., 113(7):2679-2685.
- Namina A, Capligina V, Seleznova M, Krumins R, Aleinikova D, Kivrane A, Akopjana S, Lazovska M, Berzina I, Ranka R. 2019. Tick-borne pathogens in ticks collected from dogs, Latvia, 2011–2016. BMC Veterinary Research, 15, 398.

- Norman AF, Regnery R, Jameson P, Greene C, Krause DC. 1995. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(7):1797-1803.
- Pantchev N, Pluta S, Huisinga E, Nather S, Scheifelen M, Globokar Vrhovec M, Schw3einitz A, Hampel H, Straubinger RK. 2015. Tick-borne Diseases (Borreliosis, Anaplasmosis, Babesiosis) in German and Austrian Dogs: Status quo and Review of Distribution, Transmission, Clinical Findings, Diagnostics and Prophylaxis. *Parasitol Res.*, 114 Suppl 1:S19-S54.
- Petzke M, Schwartz I. 2015. *Borrelia burgdorferi* Pathogenesis and the Immune Response. *Clin Lab Med.*, 35(4):745-764.
- Pfäffle M, Littwin N, Petney T. 2015. Host preferences of immature *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae) in a forest habitat in Germany. *Ticks Tick Borne Diseases*, 6(4):508-515.
- Pisazka V, Duscher G, Hodžić A, Reider N, Allerberger F. 2019. Alpha-gal allergy after a tick bite in Austria. *Wien Klin Wochenschr*, 131(15-16):385-388.
- Pruneau L, Moumène A, Meyer DF, Marcelino I, Lefrançois T, Vachiéry N. 2014. Understanding *Anaplasmataceae* pathogenesis using "Omics" approaches. *Frontier in Cellular and Infection Microbiology*, 4:86.
- Regier Y, O'Rourke F, Kempf VA. 2016. *Bartonella* spp. - a chance to establish One Health concepts in veterinary and human medicine. *Parasites & Vectors*, 9(1):261.
- Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. 1991. Genotypic Identification of *Rickettsiae* and Estimation of Intraspecies Sequence Divergence for Portions of Two Rickettsial Genes. *Journal of Bacteriology*, 173(5):1576-1589.
- Remesar S, Díaz P, Prieto A, Markina F, Díaz Cao JM, López-Lorenzo G, Fernández G, López CM, Panadero R, Díez-Baños P, Morrondo P. 2019. Prevalence and distribution of *Babesia* and *Theileria* species in roe deer from Spain. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 9, 195-201.
- Roux V, Fournier PE, Raoult D. 1996. Differentiation of Spotted Fever Group Rickettsiae by Sequencing and Analysis of Restriction Rragment Length Polymorphism of PCR-amplified

- DNA of the Gene Encoding the Protein rOmpA. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9):2058-2065.
- Rubel F, Brugger K, Pfeffer M, Chitima-Dobler L, Didyk YM, Leverenz S, Dautel H, Kahl O. 2016. Geographical distribution of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* in Europe. *Ticks Tick Borne Diseases*, 7(1):224-233.
- Rubel F, Brugger K, Walter M, Vogelgesang JR, Didyk YM, Fu S, Kahl O. 2018. Geographical distribution, climate adaptation and vector competence of the Eurasian hard tick *Haemaphysalis concinna*. *Ticks Tick Borne Disease*, 9(5):1080-1089.
- Sahni SK, Narra HP, Sahni A, Walker DH. 2013. Recent molecular insights into rickettsial pathogenesis and immunity. *Future Microbiol.* 8(10):1265-1288.
- Schebeck M. 2013. Zur Zeckenfauna von Wildtieren in Ostösterreich. Universität für Bodenkultur Wien.
- Schnittger L, Rodriguez AE, Florin-Christensen M, Morrison DA. 2012. *Babesia*: a world emerging. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8):1788-1809.
- Schötta AM, Wijnveld M, Stockinger H, Stanek G. 2017. Approaches for Reverse Line Blot-Based Detection of Microbial Pathogens in *Ixodes ricinus* Ticks Collected in Austria and Impact of the Chosen Method. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(13):e00489-17.
- Shaw MK. 2003. Cell invasion by *Theileria* sporozoites. *Trends in Parasitology*, 19(1):2-6.
- Šimo L, Kazimirova M, Richardson J, Bonnet SI. 2017. The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology*, 7:281.
- Sjöstedt A, Eriksson U, Berglund L, Tärnvik A. 1997. Detection of *Francisella tularensis* in Ulcers of Patients with Tularemia by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(5):1045-1048.
- Solano-Gallego L, Sainz Á, Roura X, Estrada-Peña A, Miró G. 2016. A review of canine babesiosis: the European perspective. *Parasites & Vectors*, 9, 336.
- Stanek G. 2018. Lyme borreliosis, ticks and *Borrelia* species. *Wien Klin Wochenschr.*, 130(15-16):459-462.

Víchová B, Majláthová V, Nováková M, Stanko Ma, Stanko Mi, Hviščová I, Pangrácová L, Chrudimský T, Čurlík J, Petko B. 2014. *Anaplasma* infections in ticks and reservoir host from Slovakia. *Infection, Genetics and Evolution*, 22:265-272.

Weiler M, Duscher GG, Wetscher M, Walochnik J. 2017. Tick abundance: a one year study on the impact of flood events along the banks of the river Danube, Austria. *Exp Appl Acarol.*, 71(2):151-157.

Weir W, Karagenç T, Gharbi M, Simuunza M, Aypak S, Aysul N, Darghouth MA, Shiels B, Tait A. 2011. Population diversity and multiplicity of infection in *Theileria annulata*. *International Journal for Parasitology*, 41(2):193-203.

Wijnveld M, Schötta AM, Pintér A, Stockinger H, Stanek G. 2016. Novel *Rickettsia raoultii* strain isolated and propagated from Austrian *Dermacentor reticulatus* ticks. *Parasites & Vectors*, 9(1):567.

Yabsley MJ, Shock BC. 2012. Natural history of Zoonotic *Babesia*: Role of wildlife reservoirs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2:18-31.

Zintl A, Finnerty EJ, Murphy TM, de Waal T, Gray JS. 2011. Babesias of red deer (*Cervus elaphus*) in Ireland. *Veterinary Research*, 42(1):7.

## **Bücher und Webseiten**

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2008. Molecularbiology of the Cell. 5<sup>th</sup> edition. New York, USA: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC

Estrada-Peña A, Mihalca AD, Petney TN, Hrsg. 2017. Ticks of Europe and North Africa: A Guide to Species Identification. 1. Auflage. Springer International Publishing.

Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Zugriff am 27.05.2020

<https://www.ages.at/themen/ages-schwerpunkte/vektoruebertragene-krankheiten/zecken/biologie-und-zoologie/>

Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Zugriff am 27.05.2020

<https://www.ages.at/themen/ages-schwerpunkte/vektoruebertragene-krankheiten/zecken/durch-zecken-uebertragbare-krankheiten/>

Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Zugriff am 27.05.2020

<https://www.ages.at/themen/krankheitserreger/tularaemie-hasenpest/tab/3/>

## 10. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Entwicklungszyklus von Zecken am Beispiel *Dermacentor reticulatus* 9  
Mehlhorn B und Mehlhorn H. 2009. Zecken auf dem Vormarsch. - Düsseldorf University Press: 1–174.  
Walochnik J und Aspöck H. 2010. Zecken, Babesien und Babesiose – die Rindermalaria beim Menschen. – In Aspök, H. (Hrsg.): Krank durch Arthropoden. Denisia 30: 717–731.
- Abb. 2: Vorgang des Blutsaugens und der Pathogenübertragung..... 10  
Šimo L, Kazimirova M, Richardson J, Bonnet SI. 2017. The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology*, 7:281.
- Abb. 3: Intrazellulärer Lebenszyklus von *Anaplasmataceae*..... 15  
Pruneau L, Moumène A, Meyer DF, Marcelino I, Lefrançois T, Vachiéry N. 2014. Understanding *Anaplasmataceae* pathogenesis using "Omics" approaches. *Frontier in Cellular and Infection Microbiology*, 4:86.
- Abb. 4: Intrazellulärer Infektionszyklus von Phagozyten durch *F. tularensis*..... 19  
Celli J, Zahrt TC. 2013. Mechanisms of *Francisella tularensis* Intracellular Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 3(4):a010314.
- Abb. 5: Lebenszyklus von *Babesia sensu stricto*..... 23  
Jalovecka M, Sojka D, Ascencio M, Schnittger L. 2019. Babesia Life Cycle - When Phylogeny Meets Biology. *Trends in Parasitology*, 35(5):356-368.



## 11. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zecken-Waschanleitung.....	27
Tab. 2: Temperaturprofil für den <i>Anaplasmataceae</i> -Nachweis.....	29
Tab. 3: Mastermix für den <i>Anaplasmataceae</i> -Nachweis.....	29
Tab. 4: Temperaturprofil für den <i>Anaplasmataceae</i> -Nachweis.....	30
Tab. 5: Primer der <i>Rickettsia</i> spp.-Screening-PCR.....	30
Tab. 6: Mastermix der <i>Rickettsia</i> spp.-Screening-PCR.....	31
Tab. 7: Temperaturprofil der <i>Rickettsia</i> spp.-Screening-PCR.....	31
Tab. 8: Primer der SFG- <i>Rickettsia</i> spp.-PCR.....	32
Tab. 9: Mastermix der SFG- <i>Rickettsia</i> spp.-PCR.....	32
Tab. 10: Temperaturprofil der SFG- <i>Rickettsia</i> spp.-PCR.....	32
Tab. 11: Primer der <i>F. tularensis</i> -Detektion.....	33
Tab. 12: Mastermix der <i>F. tularensis</i> -Detektion.....	33
Tab. 13: Temperaturprofil der <i>F. tularensis</i> -Detektion.....	34
Tab. 14: Primer des <i>Borrelia</i> -Nachweises.....	34
Tab. 15: Temperaturkurve des <i>Borrelia</i> -Nachweises.....	34
Tab. 16: Mastermix des <i>Borrelia</i> -Nachweises.....	35
Tab. 17: Primer der <i>Bartonella</i> -Screening-PCR.....	35
Tab. 18: Mastermix der <i>Bartonella</i> -Screening-PCR.....	36
Tab. 19: Temperaturprofil der <i>Bartonella</i> -Screening-PCR.....	36
Tab. 20: Primer der PCR der <i>gltA</i> -PCR.....	36
Tab. 21: Mastermix der PCR der <i>gltA</i> -PCR.....	37
Tab. 22: Temperaturprofil der PCR der <i>gltA</i> -PCR.....	37
Tab. 23: Primer der Nest 1 PCR.....	38
Tab. 24: Mastermix der Nest 1 PCR.....	38
Tab. 25: Temperaturprofil der Nest 1 PCR.....	39
Tab. 26: Primer der Nest 2 PCR.....	39
Tab. 27: Mastermix der Nest 2 PCR.....	39
Tab. 28: Temperaturprofil der Nest 2 PCR.....	40

## **12. Danksagung**

Abschließend möchte ich mich bei einigen Menschen bedanken:

Allen voran danke ich meinem Betreuer Dr. Hans-Peter Fuehrer sehr herzlich, der mir diese Bachelorarbeit ermöglicht hat. Jede Frage, die ich hatte, wurde von ihm schnell, wohlwollend und kompetent beantwortet, sogar sonntags, an Feiertagen und zu jeder Tages- und Nachtzeit. Auch seiner Mitarbeiterin Bitra Shahi Barogh danke ich für ihre Unterstützung und Hilfe. Beide haben mich sehr warmherzig am Institut aufgenommen und gaben mir das Gefühl, dass es „keine dummen Fragen gibt“.

Dass ich die Arbeit überhaupt machen konnte, verdanke ich Bernhard Sonnberger.

Ebenso gilt meiner Familie, insbesondere meiner Mama, großer Dank. Sie waren mir in dieser stressigen Zeit seelische Unterstützung und Motivatoren, wenn mir das Schreiben gerade nicht so leicht gefallen ist.