

Aus dem
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

**Studien zum Einfluss ausgewählter ökologischer Faktoren auf das
Wirtssuchverhalten der Zeckenarten *Ixodes ricinus* und *Dermacentor reticulatus*
sowie zur Prävalenz verschiedener zeckenübertragener Pathogene in subadulten
Stadien von *Dermacentor reticulatus***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Hannah M. Schmuck
aus Berlin

Leipzig, 2024

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Martin Pfeffer

Gutachter: Prof. Dr. Martin Pfeffer, Universität Leipzig – Institut für Tierhygiene und Öffentliches
Veterinärwesen, Leipzig

Prof. Dr. Ute Mackenstedt, Universität Hohenheim – Institut für Biologie, Stuttgart

Tag der Verteidigung: 21. November 2023

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Literaturübersicht	2
2.1	Klassifikation, Taxonomie und geschichtlicher Hintergrund von <i>I. ricinus</i> und <i>D. reticulatus</i> ...	2
2.2	Lebenszyklus	3
2.3	Wirte.....	3
2.4	Wirtssuchverhalten.....	4
2.4.1	Habitat	4
2.4.2	Saisonalität	5
2.4.3	Abhängigkeit von Wettervariablen	6
2.4.4	Zusammenhang mit Lichtverhältnissen und Tageszeiten.....	7
2.5	Auswirkungen auf den Wirt	8
2.5.1	Physiologie und Auswirkungen des Blutsaugens	8
2.5.2	Übertragung von Krankheitserregern.....	9
2.5.2.1	Babesien	10
2.5.2.2	Bartonellen	11
2.5.2.3	<i>Neoehrlichia mikurensis</i>	12
2.5.2.4	Rickettsien.....	12
3.	Tiere, Material und Methoden	13
3.1	Versuchsflächen.....	13
3.2	Zeckensammlung	14
3.3	Statistische Analysen	15
3.4	Identifizierung der juvenilen Stadien von <i>D. reticulatus</i>	15
3.5	Untersuchung auf Pathogene	15
4.	Ergebnisse	17
4.1	Gesamtzahl der Zecken	17
4.2	Saisonale Aktivitätsmuster	18
4.3	Diurnale Aktivitätsmuster	20
4.4	Einfluss der Lichtverhältnisse auf die Zeckenaktivität	22
4.5	Einfluss von relativer Luftfeuchte und Temperatur	24
4.6	Juvenile Stadien von <i>D. reticulatus</i>	25
5.	Diskussion	28
6.	Zusammenfassung.....	38
7.	Summary	40
8.	Literaturverzeichnis	42
9.	Abbildungsverzeichnis	51
10.	Tabellenverzeichnis	51
11.	Danksagung	52

12.	Anhang	53
12.1	PCR-Protokolle zum Nachweis von <i>Babesia</i> spp., <i>Bartonella</i> spp., <i>Neoehrlichia mikurensis</i> und <i>Rickettsia</i> spp.	53
12.2	Publikation.....	55

„Na Hannah, wie läuft es mit der Doktorarbeit?“

- Jeder, immer

Abkürzungsverzeichnis

16S rRNA = 16 Svedberg ribosomale Ribonukleinsäure

18S rRNA = 18 Svedberg ribosomale Ribonukleinsäure

% = Prozent

°C = Grad Celsius

µl = Mikroliter

AB = Flaggstandort „Am Bach“

Ak = Antikörper

B. bovis = *Babesia bovis*

B. caballi = *Babesia caballi*

B. canis = *Babesia canis*

BLAST = Basic Local Alignment Search Tool

B. major = *Babesia major*

B. microti = *Babesia microti*

B. divergens = *Babesia divergens*

B. ovis = *Babesia ovis*

bp = base pairs (Basenpaare)

cm = Zentimeter

CORINE = Coordination of Information on the Environment (Kordinierung von Informationen über die Umwelt)

DNA = Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)

D. reticulatus = *Dermacentor reticulatus*

EW = Flaggstandort „Eichenwald“

et al. = et alia / und andere

FSME = Frühsommer-Meningoenzephalitis

FSMEV = Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus

g = Gramm

gltA = Gen der Citrat-Synthase

groEL = bakterielles Chaperonin

ITS = internal transcribed spacer

I. hexagonus = *Ixodes hexagonus*

I. ricinus = *Ixodes ricinus*

m² = Quadratmeter

min. = Minuten

MIR = minimal infection rate (Minimale Infektionsrate)

ml = Milliliter

mm = Millimeter

N. mikurensis = *Neoehrlichia mikurensis*

ompB = Gen des Außenhüllenproteins B

PCR = polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

Q. rubra = *Quercus rubra*

RH = relative humidity (relative Luftfeuchte)

RKI = Robert-Koch-Institut

R. raoultii = *Rickettsia raoultii*

R. sibirica subsp. sibirica = *Rickettsia sibirica subspezies sibirica*

R. slovaca = *Rickettsia slovaca*

SENLAT = scalp eschar and neck lymphadenopathy after tick bite (Eschar der Kopfhaut und Lymphadenopathie des Halses nach Zeckenstich)

sek. = Sekunden

sp., spp. = Spezies Einzahl, Mehrzahl

TIBOLA = tick-borne lymphadenopathy (Zecken-übertragene Lymphadenopathie)

WR = Flaggstandort „Wegrand“

1. Einleitung

Zecken gehören zu den wichtigsten Parasiten bei Menschen und Tieren (DANTAS-TORRES et al. 2012, JONGEJAN und UILENBERG 2004). Sie sind häufige Überträger von Pathogenen und damit ein zentrales Forschungsobjekt der human- sowie veterinärmedizinischen Forschung, insbesondere unter dem One-Health-Aspekt. Aufgrund ihrer geringen Größe sowie ihrer Lebensweise, die sich oft versteckt in Vegetation oder Laubstreu abspielt, sind viele Aspekte ihrer Lebensweise jedoch bis heute ungeklärt. So ist es bei diversen Zeckenarten nicht oder nur sehr selten möglich, juvenile Stadien aufzufinden, und über die Gründe dafür kann nur spekuliert werden. Für das Verständnis und auch die Prävention zeckenübertragener Erkrankungen kann es jedoch essenziell sein, die Lebensweise der Zeckenarten genau zu kennen.

Ixodes ricinus und *Dermacentor reticulatus* sind dabei von besonderem Interesse, da sie erstens die häufigsten in Deutschland vorkommenden Zeckenarten sind (RUBEL et al. 2014) und *I. ricinus* sogar die häufigste Zeckenart in ganz Europa darstellt (GRAY et al. 2021). Zweitens sind die beiden Zeckenarten besonders für die Übertragung von Pathogenen verantwortlich, da *I. ricinus* ein sehr breites Wirtsspektrum mit über 300 terrestrischen Wirten besitzt, zu denen auch der Mensch gehört (HONIG et al. 2017, GRAY et al. 2021, ANDERSSON et al. 2018, ANDERSSON et al. 2017, GALFSKY et al. 2019, HASLE et al. 2011, HEYLEN et al. 2014, HORNOK et al. 2012) und *D. reticulatus* auf vielen verschiedenen Wild- und Nutztierarten parasitiert (FÖLDVÁRI et al. 2016, AKIMOV und NEBOGATKIN 2011, ANDERSSON et al. 2018, ANDERSSON et al. 2017, GALFSKY et al. 2019, HORNOK et al. 2012) und ebenfalls, wenn auch nur selten, Menschen befällt (CHITIMIA-DOBLER 2015, FÖLDVÁRI et al. 2013). Mit *I. ricinus* als Forschungsobjekt beschäftigten sich bereits über 4000 Studien, mehr als mit jeder anderen Zeckenart. Dennoch lässt das komplexe Zusammenspiel aus der Ökologie und dem Verhalten von Zecken und der immunologischen Antwort der Wirte noch viele Fragen offen (GRAY et al. 2021).

In der dieser Dissertation zugrundeliegenden Studie war daher die Zielsetzung, den Einfluss einiger ökologischer Faktoren auf das Wirtssuchverhalten von *D. reticulatus* und *I. ricinus* zu ergründen. Dabei wurde das Augenmerk insbesondere auf den Einfluss von Tageszeit gelegt, um zu untersuchen, ob die Aktivität der beiden Arten einer diurnalen Rhythmik unterliegt. Jedoch wurden auch die Lichtverhältnisse, relative Luftfeuchte und die Temperatur einbezogen. Zudem sollten die in der Studie aufgefundenen juvenilen Stadien von *D. reticulatus* mittels morphologischer und molekularbiologischer Methoden zweifelsfrei identifiziert werden. Diese Stadien wurden auf in Zentraleuropa vorkommende, zeckenübertragene Pathogene (*Rickettsia* spp., *Bartonella* spp., *Babesia* spp. und *N. mikurensis*) untersucht, um ihre Rolle in der Aufrechterhaltung der Infektionszyklen ergründen zu können.

2. Literaturübersicht

2.1 Klassifikation, Taxonomie und geschichtlicher Hintergrund von *I. ricinus* und *D. reticulatus*

Zecken (Ixodida) sind parasitär lebende Milben (Acari). Sie werden in die Familien Ixodidae (Schildzecken), Argasidae (Lederzecken) und Nuttalliellidae unterteilt (BARKER und MURRELL 2004). Zecken sind obligat an Wirbeltieren blutsaugende Ektoparasiten. Sie haben wie andere Spinnentiere acht Beine, ausgenommen der Larvenstadien mit sechs Beinen. Die Evolution der Zecken nahm vermutlich in Australien ihren Ursprung, wobei strittig ist, wann diese Entwicklung begann. Vertreten werden Zeitpunkte von zwischen 390 und 120 Millionen Jahren. Die ältesten Fossilien von Zecken sind nur 99 Millionen Jahre alt (CHITIMIA-DOBLER et al. 2017). Daher ist unsicher, ob Zecken zunächst auf Amphibien aus der Gruppe der Labyrinthodontia parasitierten und dann auf Vögel umstiegen, oder ob Vögel und Reptilien die ersten Wirte waren (BARKER und MURRELL 2004). Ein möglicher Treiber für die evolutionäre Trennung von Schild- und Lederzecken kann in der Entwicklung neuer biologischer Nischen durch die Entwicklung von Säugern und Vögeln in der Kreidezeit gesehen werden. Genetische Analysen der antihämostatischen Hemmstoffe im Speichel von Schild- und Lederzecken legen nahe, dass sich die blutsaugende Lebensweise bei den Ixodidae und Argasidae unabhängig voneinander entwickelt hat (MANS et al. 2002).

Die erste Beschreibung einer Zecke stammt aus dem Jahr 1746 von Linnaeus. Latreille klassifizierte 1795 als erster die Zecken in 11 Genera, die im Laufe der Jahre mehrmals revidiert und erweitert wurden. Im Jahr 2004 wurden 899 Spezies von Zecken beschrieben (BARKER und MURRELL 2004).

I. ricinus, der gemeine Holzbock, ist in Deutschland die häufigste Zeckenart. Sie ist zwischen 2,5 und 4,0 Millimeter groß. Die adulten Stadien besitzen einen ausgeprägten Geschlechtsdimorphismus, bei dem die Dorsalseite des Männchens fast komplett von einem Chitinschild, dem Scutum, bedeckt ist. Bei den Weibchen bedeckt das Scutum nur einen kleinen Teil der Dorsalseite, da ihre Cuticula sich zur Aufnahme großer Mengen Blut und zur Beherbergung von Eiern stark dehnen muss. Larven und Nymphen sind deutlich kleiner als Adulte und können unter anderem dadurch auseinandergehalten werden, dass Larven nur sechs Beine besitzen statt acht, wie alle anderen Entwicklungsstadien (DEPLAZES et al. 2021). Nymphen sind die Stadien, die am häufigsten an Menschen saugen (STANEK 2005). Die Zecken im Genus *Ixodes* besitzen keine Augen (MEHLHORN 2016).

D. reticulatus wird auch Auwaldzecke genannt. Sie gehört zur Gattung der sogenannten Buntzecken, da sie ein weißlich gemustertes, bräunliches Scutum besitzt. Dieses bedeckt auch bei dieser Art die gesamte Dorsalseite bei Männchen, jedoch nur einen kleinen Teil davon bei Weibchen. Ungesogene Weibchen sind mit 4,2 - 4,8 mm größer als Männchen (3,8 - 4,2 mm) (DEPLAZES et al. 2021). Vollgesogene Weibchen können bis zu 1 cm groß werden. Nymphen sind 1,4 - 1,8 mm und Larven nur 0,5 mm groß (FÖLDVÁRI et al. 2016). Diese Zeckenspezies befällt nur selten den Menschen. Sie macht gemeinsam mit *Haemaphysalis concinna*, der Reliktzecke, etwa 1 - 2 % der Zeckenstiche an Menschen in Deutschland aus (RKI 2019). Alle Stadien von *D. reticulatus* besitzen ein Augenpaar, das seitlich am Scutum sitzt (MEHLHORN 2016).

2.2 Lebenszyklus

Der Lebenszyklus sämtlicher Schildzecken (Familie Ixodidae) besteht aus dem Ei und drei aktiven Stadien (Larve, Nymphe und adulte Zecke). Die meisten Schildzecken folgen einem dreiwirtigen Lebenszyklus. Jedes Lebensstadium saugt nur einmal Blut, wenngleich Weibchen, die gewaltsam vom Wirt getrennt wurden, sich wieder anheften können. Die Larven nehmen auf dem ersten Wirt eine Blutmahlzeit zu sich, lassen sich fallen und häuten sich in der Umwelt zur Nymphe. Die Nymphe geht erneut auf Wirtssuche und saugt auf dem gleichen oder einem anderen Wirt erneut Blut. Auch das Nymphenstadium lässt sich nach dem Blutsaugen fallen und häutet sich zur adulten Zecke. Um Eier zu produzieren, müssen die Weibchen sich mit einem Männchen paaren und große Mengen an Blut konsumieren. Dabei steigern sie ihre Körpermasse um das bis zu 200-fache ihres ungesogenen Gewichts (KAHL und GRAY 2022). Sobald die Weibchen vollgesogen sind, fallen sie vom Wirt ab und legen ihre Eier in einem geeigneten Mikrohabitat, beispielsweise in den Wirtsbauten, in Spalten oder in der Laubstreu auf dem Boden ab. Nach der Eiablage stirbt das Weibchen (APANASKEVICH und OLIVER JR 2014). Während die Blutmahlzeit für Männchen fakultativ ist und eher dem Finden eines Weibchens zur Paarung dient, ist sie für Weibchen obligat zur Eiablage (STANEK 2005).

2.3 Wirte

Die Wirte von Zecken sind vielfältig und gehören zu den Reptilien, Vögeln und Säugetieren. Dabei ist die Aga-Kröte das einzige Amphibium, das durch eine Zeckenart (*Amblyomma rotundatum*) infestiert wird (BARKER und MURRELL 2004). Die meisten Zeckenarten haben mehrere freilebende Stadien und verbringen den größeren Anteil ihrer Lebenszeit in der Umgebung fern vom Wirt. Selbst bei Zecken, die sich während eines Großteils ihrer Lebenszeit auf dem Wirt aufhalten, wie einige Arten aus den Gattungen *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Margaropus* oder *Otobius*, legen die vollgesogenen Weibchen ihre Eier auf der Vegetation ab und die daraus geschlüpften Larven müssen einen neuen Wirt aufsuchen. Bisher ist nur eine einzige Zeckenspezies (*Ornithodoros transversus*) bekannt, die als stationärer Parasit ihr gesamtes Leben auf dem Wirt (in ihrem Fall der Galapagosschildkröte *Geochelone nigra*) verbringt (DAUTEL 2010).

Die Detektion eines Wirtstieres gelingt in der Regel mittels des Haller'schen Organs, eines speziellen Sinnesorgans auf dem ersten Beinpaar der Zecken. Wirte werden dabei über Geruch, Vibrationen, Körperwärme und ihren Schatten wahrgenommen (SÜSS et al. 2008).

Auch bei der Wirtsspezifität gibt es große Unterschiede zwischen verschiedenen Zeckenspezies. Während *I. ricinus* und *D. reticulatus* ein breites Wirtsspektrum besitzen, sind andere Zeckenarten mehr oder weniger auf eine Tierart spezialisiert. So befällt *I. ricinus* verschiedenste Arten von Säugern, Vögeln und Reptilien. Mit genetischen Methoden konnten bei *I. ricinus*-Nymphen Paarhufer als häufigste Wirte festgestellt werden, gefolgt von Nagern; Vögel, kleine Raubtiere und Insektivore waren seltener Wirte (HONIG et al. 2017). *Ixodes lividus* hingegen, als Beispiel eines engen Wirtsspektrum, parasitiert ausschließlich auf der Uferschwalbe *Riparia riparia* (STANEK 2005). Zecken mit einem engen Wirtsspektrum haben in der Regel eine nestassoziierte Lebensweise. Weitere Erläuterungen zu nestassoziiertem Lebensweise sind in Punkt 2.4 aufzufinden.

Die Wirte von *D. reticulatus*-Larven und -Nymphen sind kleine Säugetiere wie Wühlmäuse, Spitzmäuse, Hasen, Kaninchen und Igel (NOSEK 1972, OBIEGALA et al. 2014, FÖLDVÁRI et al. 2016, GALFSKY et al. 2019). In selteneren Fällen befallen sie auch Vögel (AKIMOV und NEBOGATKIN 2011). Des Weiteren stellen Hunde, Cerviden, Iltisse und Wiesel mögliche Wirte für die Nymphenstadien dar (ANDERSSON et al. 2017, HORNOK et al. 2012, NOSEK 1972). Dadurch, dass sie oft auf Wildtieren parasitieren, spielen sie eine Rolle in der Aufrechterhaltung von enzootischen Kreisläufen diverser Pathogene. Diese Rolle wird weiter in Punkt 2.5.2 erörtert.

Adulte saugen meist auf mittelgroßen bis großen, wilden oder domestizierten Tieren Blut, beispielsweise auf Hirschen, Wildschweinen, Rotfüchsen, Bisons, Hunden, Schafen, Ziegen, Rindern, Katzen und auch auf Igel, Hasen und Kaninchen (HORNOK et al. 2012, NOSEK 1972, CHITIMIA-DOBLER 2015, FÖLDVÁRI et al. 2016, SZÉLL et al. 2006, MIERZEJEWSKA et al. 2015).

2.4 Wirtssuchverhalten

Allgemein kann das Wirtssuchverhalten von Zecken in nestassoziierte und nicht-nestassoziierte Lebensweisen unterteilt werden. Ein nestassoziiertes Lebensstil bedeutet, dass die Wirtssuche im Bau oder Nest eines Wirts stattfindet und führt daher oft zu einer starken Wirtsspezifität. Dabei muss bei einer nestassoziierten Lebensweise das Abfallen vom Wirt nach dem Blutmahl mit dem Lebensrhythmus des Wirts synchronisiert werden, damit das Abfallen im Bau bzw. Nest geschieht. Dafür ist ein ausgeklügeltes System nötig, das unter anderem durch die Photoperiode und der "inneren Uhr" der Zecken gesteuert wird, um ein Abfallen der vollgesogenen Zecken auf den Wirtsbau zu beschränken (BELOZEROV 1982).

Nicht-nestassoziierte Zeckenarten suchen nach ihren Wirten, indem sie auf Vegetation klettern, das erste Beinpaar mit dem Haller'schen Organ abspitzen und darauf warten, dass ein geeigneter Wirt an ihnen vorbeiläuft und sie abstreift. Dies führt in der Regel zu einem weiteren Wirtsspektrum, da sich die Zecken nicht in den Bauten befinden, die in der Regel nur durch eine Wirtsspezies bewohnt werden, sondern unspezifisch von sämtlichen Wirtsspezies abgestreift werden können, die das Habitat bewohnen. *I. ricinus* und die adulten Stadien von *D. reticulatus* sind nicht-nestassoziiert, den juvenilen Stadien von *D. reticulatus* wird hingegen eine nestassoziierte Lebensweise in direkter Nähe zum Nagerbau zugeschrieben (APANASKEVICH und OLIVER JR 2014, FÖLDVÁRI et al. 2016).

Literatur, die sich mit dem Wirtssuchverhalten von Zecken beschäftigt, bezieht sich oft auf die „Aktivität“ von Zecken. Als Aktivität wird dabei in der Regel das Vorhandensein von Zecken auf der Vegetation und damit eine Empfänglichkeit für Stimuli durch potentielle Wirte definiert (LEES und MILNE 1951). Aktive Zecken können durch Methoden, bei denen Stofftücher über die Vegetation gezogen werden („Flaggen“ oder „Dragging“), gesammelt und quantifiziert werden, da sie sich an vorbeistreichenden Objekten festhalten (MILNE 1943).

2.4.1 Habitat

Zecken benötigen Habitate, die sowohl mit ihren klimatischen Faktoren das Überleben begünstigen als auch ausreichend Wirte beherbergen. Für die Larven- und teilweise auch die Nymphenstadien sind diese Wirte

Kleinnager; für Adulte sind diese Wirte größere Säugetiere. Das gilt sowohl für *I. ricinus* als auch für *D. reticulatus* sowie diverse andere Zeckenarten.

Während *D. reticulatus* offene Habitats wie Wiesen und Brachland bevorzugt, stellen solche Flächen kein optimales Habitat für *I. ricinus* dar, da die starken Schwankungen in Temperatur und Feuchtigkeit in Wiesen das Überleben von *I. ricinus* begrenzen (ZAJĄC et al. 2020b). Allerdings wird berichtet, dass *D. reticulatus* auch in Auwäldern vorkommt und eine gewisse Vorliebe für feuchte Habitats hegt (FÖLDEVÁRI et al. 2016). *I. ricinus* kommt darum in Wäldern deutlich öfter vor als auf Lichtungen oder Wiesen. Innerhalb von Waldhabitats scheint eine bodenbedeckende Schicht mit entweder herabgefallenem Laub oder niedriger Vegetation zur Retention von Feuchtigkeit wichtig für das Überleben von *I. ricinus* zu sein (SCHULZ et al. 2014). Darum kommt *I. ricinus* in Laubwäldern mit bodenbedeckender Vegetation häufiger vor als in uniformen Nadelwäldern, vermutlich auch aufgrund der Vorlieben von geeigneten Wirten (TACK et al. 2012). Zudem verrotten die Blätter von Eichen und Buchen langsam und bilden darum eine bodenbedeckende Laubschicht, in der über mehrere Jahre eine hohe relative Luftfeuchtigkeit vorliegt, die ein günstiges Mikroklima für *I. ricinus* bietet (KAHL und GRAY 2022).

Ein wichtiger Faktor, der die Aktivität von Schildzecken limitiert, ist ihre Empfindlichkeit gegenüber Austrocknung. Bei weniger als 80 % Luftfeuchtigkeit ist ihr Überleben gefährdet. Darum können sie nur in Habitats existieren, in denen die relative Luftfeuchte in der bodennahen Vegetation auch im Sommer nicht unter 85 % fällt (STANEK 2005).

Zecken, die ungesogen sind oder ihre Blutmahlzeit gerade beendet haben, können Wasser aus der Umwelt aufnehmen, indem sie hyroskopisches Material aus ihren Speicheldrüsen sezernieren. Dadurch können sie sich auch längere Zeit weiter oben auf der Vegetation aufhalten, um ihren Wirten aufzulauern (STANEK 2005).

2.4.2 Saisonalität

Zwischen den verschiedenen Entwicklungsstadien von Zecken gibt es oft Unterschiede in der Aktivität. So sind die adulten Stadien von *Dermacentor reticulatus* nicht nestassoziiert. Darum können sie durch Techniken wie beispielsweise die Flag- oder die Drag-Methode von der Vegetation, auf der sie auf einen vorbeikommenden Wirt warten, abgesammelt werden. Sie können auch in milden Wintern aktiv sein, zeigen aber vor allem im Frühling und Herbst den Höhepunkt ihrer Aktivität. Im Sommer zeigen die Adulten praktisch keine Wirtssuchaktivität. Es wird berichtet, dass die Männchen danach früher als die Weibchen ihr Wirtssuchverhalten wieder steigern und diese sogar mengenmäßig übertreffen (THARME 1993). Dies widerspricht der sonst geltenden Beobachtung, dass Weibchen in der Regel in deutlich größeren Zahlen als Männchen geflaggt werden können, was durch die Paarungsstrategie, höhere Überlebensraten der Weibchen sowie genetische Mechanismen erklärt wird (THARME 1993, BARTOSIK et al. 2012, BUCZEK et al. 2014, FÖLDEVÁRI et al. 2016). Die juvenilen Stadien gelten laut der Literatur als nestassoziiert und leben in oder nahe den Bauten von Kleinnagern und werden von den meisten Studien nur auf diesen Wirten nachgewiesen (FÖLDEVÁRI et al. 2016, OBIEGALA et al. 2016, OBIEGALA et al. 2017). Larven und Nymphen sind nur

im Sommer für eine relativ kurze Zeit aktiv. Larven werden meist im Juni und Juli auf Nagern gefunden, Nymphen im Juli und August (THARME 1993, PFÄFFLE et al. 2015, FÖLDVÁRI et al. 2016, KOHN et al. 2019). In seltenen Fällen werden einzelne *D. reticulatus* Larven und Nymphen mittels Flag-Methode gesammelt, beispielsweise zwei Larven und eine Nymphe im Jahr 1988 in Wales (THARME 1993).

Bei *I. ricinus* wird auch oft von einem bimodalen Aktivitätsmuster mit Höhepunkten im Frühling und Herbst berichtet. Dieses scheint allerdings weniger ausgeprägt als bei *D. reticulatus* zu sein, da selbst im Hochsommer wirtssuchende *I. ricinus* gefunden werden können. Des Weiteren zeigt sich in vielen Studien, dass in verschiedenen Jahren oder an unterschiedlichen Standorten auch verschiedene, teils bi- und teils unimodale, Aktivitätsmuster beobachtet werden können (BRUGGER et al. 2017, DANIEL et al. 2004, DANIEL et al. 2015). Mittlerweile kann, zumindest in Gegenden mit milden Wintern, eine ganzjährige Aktivität festgestellt werden (REYNOLDS et al. 2022, DAUTEL et al. 2008).

2.4.3 Abhängigkeit von Wettervariablen

Das Wirtssuchverhalten von *I. ricinus* und *D. reticulatus* ist von Temperatur und Feuchtigkeit abhängig. Da diese Zeckenarten empfindlich gegenüber Austrocknung sind (LEES 1946), müssen sie ihre Lauerstellung auf der Vegetation regelmäßig verlassen und in die feuchteren Bereiche in der Laubstreu und in der bodenbewachsenden Vegetation zurückkehren, um dort Wasser zu absorbieren (MILNE 1950). Die Temperatur ist ebenfalls ein wichtiger Faktor. So wird die niedrigste Temperatur, bei der in Studien noch Wirtssuchaktivität festgestellt werden konnte, bei *D. reticulatus* mit 1 °C nach morgendlichem Schneefall und bei *I. ricinus* mit 4 °C angegeben (DAUTEL 2010), obwohl einzelne Studien auch von aktiven *I. ricinus* bei niedrigeren Temperaturen berichten (SCHULZ et al. 2014).

Unglücklicherweise ist der genaue Einfluss dieser und weiterer Parameter schwer einzuschätzen, was auch an den zahlreichen Studien zu diesem Thema und deren teilweise deutlich abweichenden Ergebnissen ersichtlich ist. Diese Abweichungen sind sicherlich zum Teil den unterschiedlichen Studiendesigns und Methoden zur Ermittlung der Parameter geschuldet. So unterscheidet sich beispielsweise die relative Luftfeuchtigkeit zwischen Messungen einer nahen Wetterstation von Messungen direkt am Flaggort und zeigt auch eine unterschiedliche Variation. Darum scheint die oft verwendete Methodik, Wetterdaten von Wetterstationen zu benutzen, nicht ideal zu sein (BOEHNKE et al. 2017). Allerdings gibt es trotzdem Studien, die verlässliche Vorsagemodelle auf Basis von Wetterdaten einer Wetterstation und weiterer Parameter erstellen konnten. So konnte ein Vorhersagemodell mit Daten der Buchenmast und Jahresdurchschnittstemperatur einer Wetterstation mit Zeitverzögerung von zwei Jahren bzw. einem Jahr die Aktivität von *I. ricinus* vorhersagen (BRUGGER et al. 2018). Eine andere Studie fand heraus, dass das beste Modell für die Aktivität von *I. ricinus*-Nymphen die Temperatur im monatlichen Vergleich, die durchschnittliche relative Luftfeuchte des untersuchten Monats sowie des Monats davor und die Durchschnittstemperatur vier bis sechs Monate vor dem untersuchten Monat sowie Jagdstatistiken des vorherigen Jahres einschloss. Dabei wurden ebenfalls Wetterdaten einer Wetterstation verwendet (BRUGGER et al. 2017). Eine retrospektive Studie kommt zu dem Ergebnis, dass eine erhöhte Prävalenz zeckenübertragener Erkrankungen und damit auch Zeckenaktivität in Zusammenhang mit Regenmengen und Temperaturen steht (GROCHOWSKA et al. 2020).

Für Adulte von *D. reticulatus* scheinen bereits kurze Perioden mit höherer Luftfeuchte für die Wirtssuche auszureichen, die auch bei darauffolgenden trockeneren Phasen nicht wieder eingestellt wird. Größere Mengen an Regen (>10 mm/Tag) können die Zeckenaktivität jedoch reduzieren, insbesondere in Kombination mit einem Kälteeinbruch (LESCHNIK et al. 2008). In Laborexperimenten ist die Überlebenszeit von adulten *D. reticulatus* bei eher niedrigen Temperaturen und hoher Luftfeuchte (5 °C und 100 %) am längsten und bei hohen Temperaturen und niedriger Luftfeuchte (27 °C und 15 %) am niedrigsten (ZÄHLER und GOTHE 1995).

Aus diesen Studien lässt sich bereits folgern, dass die Aktivität von Zecken von verschiedenen Wetterparametern und der Verfügbarkeit von Wirtstieren beeinflusst wird, wobei dieser Einfluss jedoch je nach Studie und auch Studienort unterschiedlich sein kann. Des Weiteren reagieren Zecken oft mit einer mehr oder weniger großen Verzögerung auf die Änderung der Parameter.

2.4.4 Zusammenhang mit Lichtverhältnissen und Tageszeiten

Die meisten Feldstudien, die die zeitlichen Unterschiede in der Wirtssuchaktivität untersuchen, konzentrieren sich auf monatliche oder jahreszeitliche Unterschiede. Das Design vieler Studien besteht daraus, dass einmal monatlich zur etwa selben Tageszeit wirtssuchende Zecken gesammelt werden. Zu tageszeitlichen Rhythmen und Unterschieden gibt es allerdings wenige Studien. MEJLON (1997) führte eine Studie in Schweden durch, bei der in Intervallen von vier Stunden in zwei verschiedenen Habitaten (Wald und Wiese) Zecken mittels Flagg-Methode gesammelt wurden. Dabei ist die Zeit der höchsten Aktivität vom Habitat abhängig. Es gibt Hinweise, dass genetische Faktoren Unterschiede in der tageszeitlichen Aktivität von Nymphen bedingen (JENSEN et al. 1999).

Des Weiteren muss bei der Untersuchung von tageszeitlichen Rhythmen beachtet werden, dass dieselbe Tageszeit durch die jahreszeitlichen Änderungen in der Tageslichtlänge an unterschiedlichen Punkten im Tageslichtzyklus liegen. Beispielsweise wäre ein Flagggen um 17:00 in den Sommermonaten noch deutlich im Tageslicht, in den späten Herbst- oder Wintermonaten jedoch bereits im Dunkeln. Dadurch kann es, obwohl das Flagggen immer zur gleichen Tageszeit durchgeführt wird, zu einer Verzerrung der Ergebnisse kommen.

In Laborexperimenten kann bewiesen werden, dass *I. ricinus*, die anders als *D. reticulatus* keine Augen haben, dennoch Photorezeptoren besitzen und auch auf unterschiedliche Lichtregimes reagieren. In diesen Experimenten zeigen die Zecken den Großteil ihrer horizontalen Fortbewegung während der Dunkelperiode mit einem Maximum kurz nach Beginn der Dunkel- und der Lichtperiode (PERRET 2003).

Bei in der Natur geflaggtten adulten *Ixodes scapularis*-Zecken kann im Labor eine bimodale Bewegungsaktivität beobachtet werden, bei der die Hauptwirtssuchaktivität kurz nach Beginn der Dunkel- und Lichtphase stattfindet. Dabei zeigen sich auch im Labor jahreszeitliche Unterschiede, beispielsweise kann im Herbst eine beträchtliche Aktivität während der Lichtperiode festgestellt werden. Hingegen wird bei Adulten, die im Winter und Frühling gefangen wurden, im Labor ein unimodales Aktivitätsmuster mit einem Aktivitätshöhepunkt kurz nach dem Beginn der Dunkelperiode und wenig Aktivität während der Lichtperiode beobachtet. Wenn man nur die Temperatur ändert, zeigen die Zecken ein unimodales Aktivitätsmuster,

während Änderungen ausschließlich in der Lichtintensität ein bimodales Aktivitätsmuster hervorbringt (MADDEN und MADDEN 2005).

Tageszeitliche Änderungen in der Wirtssuchaktivität bei *D. reticulatus* wurden in einer polnischen Studie mit fünf Flaggintervallen zwischen 10:00 und 18:00 untersucht. Dabei zeigt sich, dass die Zecken unterschiedliche Aktivitätsmuster im Frühling (höchste Zeckenzahlen um 18:00) und Herbst (höchste Zeckenzahlen um 14:00) zeigen (BARTOSIK et al. 2012).

Aus diesen Experimenten lässt sich folgern, dass die Aktivität von Zecken nicht nur von Temperatur, Feuchtigkeit, Verfügbarkeit der Wirte und internen Faktoren abhängt, sondern auch von Licht und / oder einem tageszeitlichen Rhythmus. Es erscheint wahrscheinlich, dass alle dieser Faktoren zu einem gewissen Maß die Zeckenaktivität beeinflussen. Welcher Faktor die Aktivität aber in welchem Maß beeinflusst, bleibt weiterhin unklar und schwer zu beurteilen.

2.5 Auswirkungen auf den Wirt

I. ricinus und *D. reticulatus* parasitieren, wie unter 2.3. beschrieben, auf einer Vielzahl von Tieren und auch dem Menschen. Durch diesen Parasitismus entstehen dem Wirt verschiedene Nachteile. Nicht nur eine lokale Reaktion an der Einstichstelle, teilweise mit Juckreiz und Rötung, sondern auch zeckenübertragene Erkrankungen spielen dabei eine Rolle. Bei anderen Zeckenarten, die größere Blutvolumina saugen, kann auch allein der Blutentzug bereits negative Auswirkungen auf den Wirt haben. Diese nachteiligen Effekte treten ebenfalls bei Zeckenarten auf, die nur kleine Mengen Blut saugen, wenn ein massiver Befall vorliegt, oder der Wirt klein oder geschwächt ist. So verlieren Elchkälber (*Alces alces*) bei massivem Befall mit *Dermacentor albipictus* täglich bis zu 8% ihres gesamten Blutvolumens an die Blutmahlzeit der Zecken. Insbesondere gegen Ende des Winters ist bei Elchkälbern, aber auch geschwächten Adulten, ein mit diesem Blutverlust assoziiertes Versterben möglich (MUSANTE et al. 2007). Bei europäischen Igel (*Erinaceus europaeus*) kann es durch den Befall mit *I. ricinus* und *I. hexagonus* zu Anämie und erhöhter Morbidität kommen (PFÄFFLE et al. 2009).

2.5.1 Physiologie und Auswirkungen des Blutsaugens

Die Dauer einer Blutmahlzeit hängt vom Entwicklungsstadium der Zecken ab. Bei *I. ricinus* variiert die Dauer zwischen zwei Tagen bei Larven und bis zu zehn Tagen bei adulten Weibchen. Das aufgenommene Blut wird dann drei- bis fünffach konzentriert und überschüssiges Wasser wird zurück in den Wirt abgegeben. Dies passiert durch einen Pumpmechanismus, bei dem die Übertragung der meisten zeckenübertragenen Pathogene auf den Wirt durch die Speicheldrüsen stattfindet (SÜSS et al. 2008). Diese Speichelabgabe in den Wirt findet dabei alternierend mit dem Blutsaugen statt (ŠIMO et al. 2017).

Zecken sind sogenannte "Pool feeder". Das heißt, dass sie mit ihren Chelizeren eine Wunde in die Haut ihres Wirtes reißen und alle austretenden Flüssigkeiten aufnehmen. Also nehmen sie nicht nur Blut, sondern auch Gewebsflüssigkeit auf. Im Gegensatz dazu stehen die "Kapillarsauger" oder "Solenophagen", die gezielt mit ihrem sehr dünnen Mundwerkzeug direkt in ein Blutgefäß stechen. Zu ihnen gehören beispielsweise Stechmücken. Nach dem Durchtrennen der Haut führen Zecken ihr Hypostom in die Wunde ein und verankern sich mit dem Zement, der von den Speicheldrüsen sezerniert wird, fest an ihrem Platz. Dabei sezernieren sie

auch vasoaktive Substanzen und Immunmodulatoren in den „feeding pool“, damit das Blut nicht gerinnt und die Abwehrreaktion des Wirts unterdrückt wird (STANEK 2005).

Zeckenübertragene Pathogene werden während des Blutmahls auf infizierten Wirten von den Zecken mit aufgenommen. Dabei treten sie im Mitteldarm über das Verdauungsepithel in das Haemocoel (die Leibeshöhle) über. Dort dringen sie durch das Epithel in die Speicheldrüsen ein und können sodann über den Speichel auf den nächsten Wirt übertragen werden. (ŠIMO et al. 2017)

Bei der Blutmahlzeit kommt es zu einer deutlichen Massezunahme. So kann es bei Weibchen von *I. ricinus* zu einer 200-fachen Zunahme der Körpermasse kommen. Dies macht komplexe strukturell-anatomische und physiologische Prozesse nötig, damit es nicht zu einem Platzen der Zecke kommt. Während der ersten Tage der Blutmahlzeit vergrößern sich die Cuticula und das Darmepithel, um das Blut absorbieren zu können. Erst nach 12 bis 24 Stunden geschehen morphologische Veränderungen in der Zecke (SÜSS et al. 2008). Die Verdauung und Häutung zu einem neuen Entwicklungsstadium dauern in gemäßigten Klimazonen bis zu einigen Monaten. Bei *I. ricinus* können fast zwei Jahre zwischen den Blutmahlzeiten vergehen (DAUTEL et al. 2008).

Der Befall von Tieren und Menschen mit Zecken hat nicht nur Auswirkungen durch die Übertragung von Krankheitserregern, sondern insbesondere in der kommerziellen Tierhaltung entstehen teils massive finanzielle Verluste durch Zeckenbefall. Australische Rinderbauern berichten beispielsweise über nicht unerhebliche, durch Zeckenbefall entstehende, Kosten, die zu annähernd gleichen Anteilen durch Aufwendungen für Prävention und Produktionsverluste anfallen (JONSSON et al. 2001). Die Produktionsverluste betreffen dabei sowohl geringere Milchproduktion als auch geringere Gewichtszunahmen der Milchrinder. Jedes saugende *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Weibchen verursacht einen Verlust von 8,9 ml täglicher Milchproduktion und 1,0 g Körpergewicht über einen Zeitraum von 15 Wochen (JONSSON et al. 1998).

2.5.2 Übertragung von Krankheitserregern

Zecken sind, global gesehen, die wichtigsten Vektoren für Pathogene, die Tiere betreffen, und die zweitwichtigsten Vektoren für humane Erkrankungen, wobei sie nur von Stechmücken übertroffen werden (DANTAS-TORRES et al. 2012). Die Erstbeschreibung einer zeckenübertragenen humanen Erkrankung erfolgte im Jahr 1883 durch Alfred Buchwald (BUCHWALD 1883). Er beschrieb erstmals die Acrodermatitis chronica atrophicans, die eine Manifestation der Lyme-Borreliose darstellt. Die Borreliose gilt heute als häufigste durch Zecken übertragene Infektionskrankheit in der nördlichen Hemisphäre (SÜSS et al. 2004). Die Frühsommer-Meningoenzephalitis wurde 1931 als „Meningitis serosa“ zum ersten Mal beschrieben (SCHNEIDER H. 1931). 1937 folgte dann die Isolierung des FSME-Virus in Russland durch Lev Alexandrovich Zilber (ZILBER 1939). Mittlerweile sind zahlreiche Krankheitserreger aus verschiedenen Erregergruppen (Viren, Bakterien, Parasiten) bekannt, die durch Zecken übertragen werden. Diese Erreger zirkulieren in verschiedenen Kreisläufen, in denen Zeckenspezies den Vektor und / oder das Erregerreservoir darstellen. So weisen beispielsweise hohe Prävalenzen von *R. raoultii* in *D. reticulatus*-Larven und -Nymphen

bei niedrigen Prävalenzen in den Nagewirten darauf hin, dass *D. reticulatus* eine essentielle Rolle in der Verbreitung und Erhaltung dieses Erregers spielt (OBIEGALA et al. 2016). Bei Rickettsien stellen Zecken also nicht nur den Vektor, sondern gleichzeitig auch das Reservoir dar (PAROLA und RAOULT 2001). Durch vermehrtes Screening auf verschiedene Erreger werden auch zunehmend Doppelt- oder Mehrfachinfektionen entdeckt (SÜSS et al. 2004, GALFSKY et al. 2019, PFEFFER et al. 2021).

Die meisten Krankheitserreger werden in den Zecken transstadial übertragen. Das heißt, dass sich ein jüngeres Entwicklungsstadium bei der Blutmahlzeit infiziert, sich häutet und bei der folgenden Blutmahlzeit im nächsten Entwicklungsstadium den neuen Wirt infizieren kann. Manche Krankheitserreger können auch transovarial übertragen werden, das heißt, dass ein adultes Weibchen den Erreger auf seinen Nachwuchs übertragen kann. Voraussetzung für die Infektion der Zecke ist dabei in der Regel, dass das Pathogen im Blut des Wirtes zirkuliert. Eine Ausnahme von dieser Regel stellt das Co-Feeding dar. Dieser Begriff bezeichnet das Phänomen, dass zwei Zecken, die in enger Nachbarschaft auf demselben Tier saugen, einen Krankheitserreger untereinander übertragen können, ohne dass das Wirtstier systemisch infiziert, also bakteriämisch, virämisch oder parasitämisch, ist. Dabei werden die Erreger durch zelluläre Infiltrate und Migration dieser Zellen zwischen den Anheftungsstellen der Zecken von einer Zecke zur anderen übertragen. Dieser Infektionsweg wird vor allem bei der Übertragung des FSMEV beschrieben (RANDOLPH et al. 1996, STANEK 2005).

D. reticulatus ist ebenfalls ein wichtiger Vektor zeckenübertragener Krankheiten bei Mensch und Tier, beispielsweise der Caninen Babesiose, Rickettsiose, des Omsk Hämorrhagischen Fiebers und der FSME (RŮŽEK et al. 2010, PAROLA et al. 2013, SCHAARSCHMIDT et al. 2013, FÖLDVÁRI et al. 2016, LIČKOVÁ et al. 2020).

Zeckenstiche werden als solche nicht systematisch erfasst, aber einige der Zecken-übertragenen Erkrankungen, die somit Rückschlüsse darüber erlauben, ob mehr oder weniger Menschen hiervon betroffen sind. So zeigen sich hinsichtlich der FSME-Infektionen über die letzten 20 Jahre und der Borreliose seit der Meldepflicht steigende Trends auch in den urbanen Bereichen (RKI 2022). Die Ursachen hierfür sind nicht klar, aber vermutlich spielen der Klimawandel und die Ausbreitung menschlicher Agglomerationen, die den Lebensraum von Zecken in Beschlag nehmen, sowie das Freizeitverhalten der Menschen eine Rolle (GROCHOWSKA et al. 2020). Auch die zunehmende geographische Verbreitung von z. B. *D. reticulatus* in Deutschland in den letzten beiden Jahrzehnten steigert das Risiko zeckenübertragener Erkrankungen (SPRINGER et al., 2022).

2.5.2.1 Babesien

Babesien sind einzellige Apicomplexa, die in den Erythrozyten verschiedener Säugetiere parasitieren. Menschen sind eher selten betroffen, da nur wenige Babesienarten wie *B. microti* und *B. divergens* eine Erkrankung bei ihnen auslösen können. In Schweden und Norwegen scheint *B. venatorum* ebenfalls von einer gewissen Wichtigkeit zu sein (HASLE et al. 2011, KARLSSON und ANDERSSON 2016). In Mitteleuropa sind nur vereinzelte Infektionsfälle bekannt und diese betreffen vor allem splenektomierte und anderweitig immunsupprimierte Personen (STANEK 2005, HÄSELBARTH et al. 2007). Allerdings wurde in

Süddeutschland eine Seroprävalenz von Antikörpern gegen *B. microti* und *B. divergens* von 5,4 % (25 von 467) und 3,6 % (17 von 467) ermittelt. Dabei waren signifikant mehr Menschen mit Zeckenexposition seropositiv als aus der Kontrollgruppe (HUNFELD et al. 2002). Darum erscheint es möglich, dass Babesiose beim Menschen auch in Deutschland häufiger vorkommt als allgemein angenommen. AZAGI et al. (2020) berichten, dass die Symptome einer Infektion mit *B. microti* bei fast allen Erkrankten Fieber und Anämie sowie bei etwa der Hälfte der Erkrankten Schüttelfrost, Unwohlsein, Kopfschmerzen und abdominelle Beschwerden umfassen. In 86 % der analysierten Fallberichte war eine Hospitalisierung vonnöten, es verstarb aber keiner der Patienten. Alle in dieser Veröffentlichung thematisierten Infizierten hatten sich jedoch außerhalb Europas (in Uruguay und Nordamerika) infiziert. Infektionen mit *B. divergens* resultieren ebenfalls vor allem in Fieber. Als weniger häufige Symptome werden Anämie, Unwohlsein, Ikterus, abdominelle Beschwerden und dunkler Urin beschrieben. Hier mussten 91 % der 11 Fälle hospitalisiert werden. 64 % waren immunsupprimiert, davon 54 % splenektomiert. Vier der 11 Patienten verstarben.

Babesien vollziehen ihren sexuellen Vermehrungszyklus in Schildzecken, die durch transovariable Übertragung auch als Erregerreservoir fungieren. Sie werden durch einen Zeckenstich von der Zecke auf ein Wirbeltier übertragen, befallen deren Erythrozyten und vollziehen in ihnen den asexuellen Teil ihrer Vermehrung (JALOVECKA et al. 2019).

Weltweit sind über 100 Babesienarten beschrieben, auch in Mitteleuropa sind zahlreiche Arten nachgewiesen, darunter *B. bovis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. divergens* und *B. major*. *D. reticulatus* ist ein Vektor für *B. caballi* und *B. canis*, die Babesiose bei Hunden und Pferden auslösen. Die Canine Babesiose zeigt eine bimodale Verteilung mit Infektionsmaxima im Frühling und Herbst, die mit der Aktivität adulter *D. reticulatus* zu korrelieren scheint (LESCHNIK et al. 2008). Für *B. canis* kann die vertikale Übertragung bei *D. reticulatus* in Feldstudien bestätigt werden (DWUZNIK et al. 2019). *Babesia microti* und *B. divergens* werden hingegen von *I. ricinus* übertragen (GRAY et al. 2019). Außerdem wird *B. microti* auch in wirtssuchenden *D. reticulatus* nachgewiesen, allerdings ist für diese Zeckenart die Vektorkompetenz noch nicht bewiesen (WÓJCIK-FATLA et al. 2012, GALFSKY et al. 2019). Auch in nicht-einheimischen Säugetierspezies kommen Infektionen mit *Babesia* spp. vor. So konnten in 23,6 % von 123 klinisch gesunden Rentieren in Deutschland mittels PCR Babesien nachgewiesen werden (WIEGMANN et al. 2015).

In *I. ricinus* Zecken wurden in bayerischen Parks Prävalenzen von *Babesia* spp. von 0,4 bis 0,7 % nachgewiesen (SCHORN et al. 2011).

2.5.2.2 Bartonellen

Bartonellen sind vektorübertragene, gram-negative alpha-Proteobakterien. Humane Infektionen mit Bartonellen sind zumeist auf *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana* und *Bartonella bacilliformis* zurückzuführen. Es handelt sich um fakultative intrazelluläre Krankheitserreger, die milde bis schwer verlaufende Erkrankungen bei Tieren und Menschen verursachen können, beispielsweise die Katzenkratzkrankheit, deren Erreger *Bartonella henselae* ist (PRUTSKY et al. 2013). Infektionen von

Menschen mit nagetierassoziierten Bartonellen-Spezies sind bisher sehr selten beschrieben und es bleibt unklar, ob bei diesen Infektionen Übertragung durch Vektoren eine Rolle spielt (KRÜGEL et al. 2022).

Bartonellen können in einer Vielzahl von Arthropoden nachgewiesen werden, beispielsweise in Flöhen, Läusen und Lausfliegen (TSAI et al. 2010, BOWN et al. 2004, HALOS et al. 2004, SILAGHI et al. 2016). Auch in *D. reticulatus* werden Bartonellen gefunden (GALFSKY et al. 2019, REYE et al. 2013). Die Vektorkompetenz von Zecken ist nicht abschließend geklärt, erscheint für *I. ricinus* jedoch wahrscheinlich (BILLETER et al. 2008, COTTÉ et al. 2008). Transovarielle und transstadiale Übertragung in *I. ricinus* kann in Laborexperimenten nachgewiesen werden (KRÓL et al. 2021). Nachweise von Bartonellen aus Zecken gelingen in der Regel in von Nagetieren abgesammelten Zecken (SILAGHI et al. 2016, GALFSKY et al. 2019). Nachweise aus geflaggtten Zecken gelingen mit unterschiedlichem Erfolg. Während es in einigen Studien trotz großer Zeckenzahlen nicht gelingt, Bartonellen nachzuweisen, (SCHORN et al. 2011, TIJSSE-KLASSEN et al. 2011), können in anderen Studien Prävalenzen von 12,8 % (DIETRICH et al. 2010) und 9,8 % (HALOS et al. 2005) in wirtssuchenden *I. ricinus* festgestellt werden.

Das Reservoir für die meisten Bartonellen-Spezies sind Nager (TSAI et al. 2010, LEI und OLIVAL 2014, KRÜGEL et al. 2020).

2.5.2.3 *Neoehrlichia mikurensis*

Neoehrlichia mikurensis ist ein zeckenübertragenes, gram-negatives, obligat intrazelluläres Bakterium. Der Erreger ist in Zecken und Nagern in Europa weit verbreitet und wird vor allem durch *I. ricinus* übertragen (PORTILLO et al. 2018, ANDERSSON et al. 2013), kann aber auch in *D. reticulatus* nachgewiesen werden (OBIEGALA et al. 2014). Die transovarielle Übertragung bei *I. ricinus* erscheint sehr wahrscheinlich (ONDRUŠ et al. 2020). Dieses Bakterium löst vor allem fieberhafte Erkrankungen und vaskuläre Komplikationen hervor, oft bei immunsupprimierten Patienten (LOEWENICH et al. 2010, OBIEGALA und SILAGHI 2018). *N. mikurensis* konnte jedoch auch in 0,7 % der Proben von asymptomatischen Blutspendern in Schweden nachgewiesen werden (LABBÉ SANDELIN et al. 2022). Das Reservoir für *N. mikurensis* sind Kleinnager, vor allem aus den Genera *Myodes*, *Microtus* und *Apodemus* (OBIEGALA und SILAGHI 2018).

2.5.2.4 Rickettsien

Rickettsien sind gram-negative, obligat intrazelluläre Bakterien, die vor allem die Gefäßendothelien befallen. Sie vermehren sich im Zytoplasma der Zellen aller Organe der Zecke und werden über den Zeckenspeichel übertragen (STANEK 2005). Bei dieser Erregergruppe stellen Zecken nicht nur den Vektor, sondern auch das Reservoir dar (PAROLA und RAOULT 2001). Viele Rickettsien wurden bereits lange, bevor sie mit Erkrankungen assoziiert werden konnten, in Zecken nachgewiesen (PADDOCK 2009). Diese Bakterien sind meist pathogen für Wirbeltiere und werden durch eine Reihe blutsaugender Arthropoden übertragen (MERHEJ und RAOULT 2011).

Rickettsien können in verschiedene Untergruppen aufgeteilt werden: Die Fleckfieber-Gruppe, die Typhus-Gruppe, die *Rickettsia-bellii*-Gruppe und die *Rickettsia-canadensis*-Gruppe. In der Fleckfieber-Gruppe sind hauptsächlich zoonotische und zeckenübertragene Rickettsien enthalten (PAROLA et al. 2013). *Rickettsia*

raoultii gehört zu dieser Gruppe und manifestiert sich beim Menschen mit milden bis febrilen Erkrankungen sowie dem SENLAT-Syndrom, vorwiegend bei Kindern (FOISSAC et al., FÖLDVÁRI et al. 2013, STANEK 2005). Dieses Syndrom wurde 1996 erstmals unter dem Namen „TIBOLA“ beschrieben und äußert sich in vergrößerten, teils schmerzhaften regionalen Lymphknoten und einer vesikulären ulzerativen Hautreaktion an der Zeckenstichstelle, die sich fast immer auf der behaarten Kopfhaut befindet (STANEK 2005). Vor allem *D. reticulatus* überträgt in Europa *R. raoultii* und gilt auch als potenzieller Vektor für *R. sibirica subsp. sibirica* und *R. slovaca* (PAROLA et al. 2013, FÖLDVÁRI et al. 2013, ŠPITALSKÁ et al. 2012). Hauptvektor für *R. slovaca* ist jedoch *Dermacentor marginatus* (STANEK 2005).

Für verschiedene Rickettsien- und Zeckenspezies beschreiben diverse Studien hohe transovariable Übertragungsraten sowie Infektionsraten der Nachkommen von bis zu 100 % (PAROLA et al. 2013, MOORE et al. 2018, MACALUSO et al. 2001, ALBERDI et al. 2012, SAMOYLENKO et al. 2009).

Bei einer Studie in bayerischen Parks konnten Prävalenzen in geflaggten *I. ricinus* zwischen 6,4 und 7,7 % nachgewiesen werden (SCHORN et al. 2011). In einer sächsischen Studie wurden in *D. reticulatus* Larven und Nymphen, die von Nagetieren abgesammelt wurden, Prävalenzen von *R. raoultii* von 80 bzw. 86 % nachgewiesen, was darauf hinweist, dass die transovariable Übertragung bei diesem Erreger eine wichtige Rolle spielt (OBIEGALA et al. 2016).

3. Tiere, Material und Methoden

3.1 Versuchsflächen

Zwischen Juni 2018 und November 2019 wurden im südlichen Teil von Leipzig (Sachsen, Deutschland) an drei geographisch nahe beieinander liegenden, jedoch durch ihren Bewuchs sehr unterschiedliche Flächen, durch die Flaggmethode Zecken gesammelt. Im Dezember und Januar 2018 wurde das Zeckenflaggen nicht durchgeführt, da in diesen Monaten eine sehr geringe Zeckenaktivität erwartet wurde. Die drei beprobten Flächen repräsentieren einen Auwald (AB), eine junge Eichenplantage (EW) und einen Wegrand am Rande einer Eichenplantage (WR) (siehe Abbildungen 1 und 2). Die Flächen wurden ausgewählt, da aufgrund ihrer Vegetationsunterschiede mit dem Antreffen beider lokal verbreiteter Zeckenspezies (*I. ricinus* und *D. reticulatus*) zu rechnen ist, aufgrund von früheren Studien in der Nähe dieser Standorte (GALFSKY et al. 2019) und aus logistischen Gründen (günstige Erreichbarkeit). Alle drei Flächen lagen innerhalb eines Radius von 8 km. Die Fläche „AB“ ist durch eine dichte Vegetation aus Laubbäumen und saisonalem Unterwuchs von Bärlauch gekennzeichnet und befindet sich in der Nähe eines Bachlaufes. Die Fläche „EW“ besteht aus dicht gepflanzten jungen Roteichen (*Quercus rubra*), gemischt mit Birken und einer reichhaltigen Schicht aus Laubstreu sowie fast komplett ohne bodenbedeckende Vegetation. Bei der Fläche am Wegesrand „WR“ handelt es sich um einen grasbewachsenen Randstreifen direkt neben einem Gehweg und teilweise im Schatten einer Anpflanzung von *Q. rubra*. Alle drei Orte werden in der CORINE-Bodenbedeckungsklassifikation als "Laubwald" eingestuft, obwohl sich die Vegetation auf kleinskaligerer Ebene erheblich unterscheidet. Sie sind Lebensraum für verschiedene Wildtierarten wie Rehe, Wildschweine, Füchse und Waschbären.

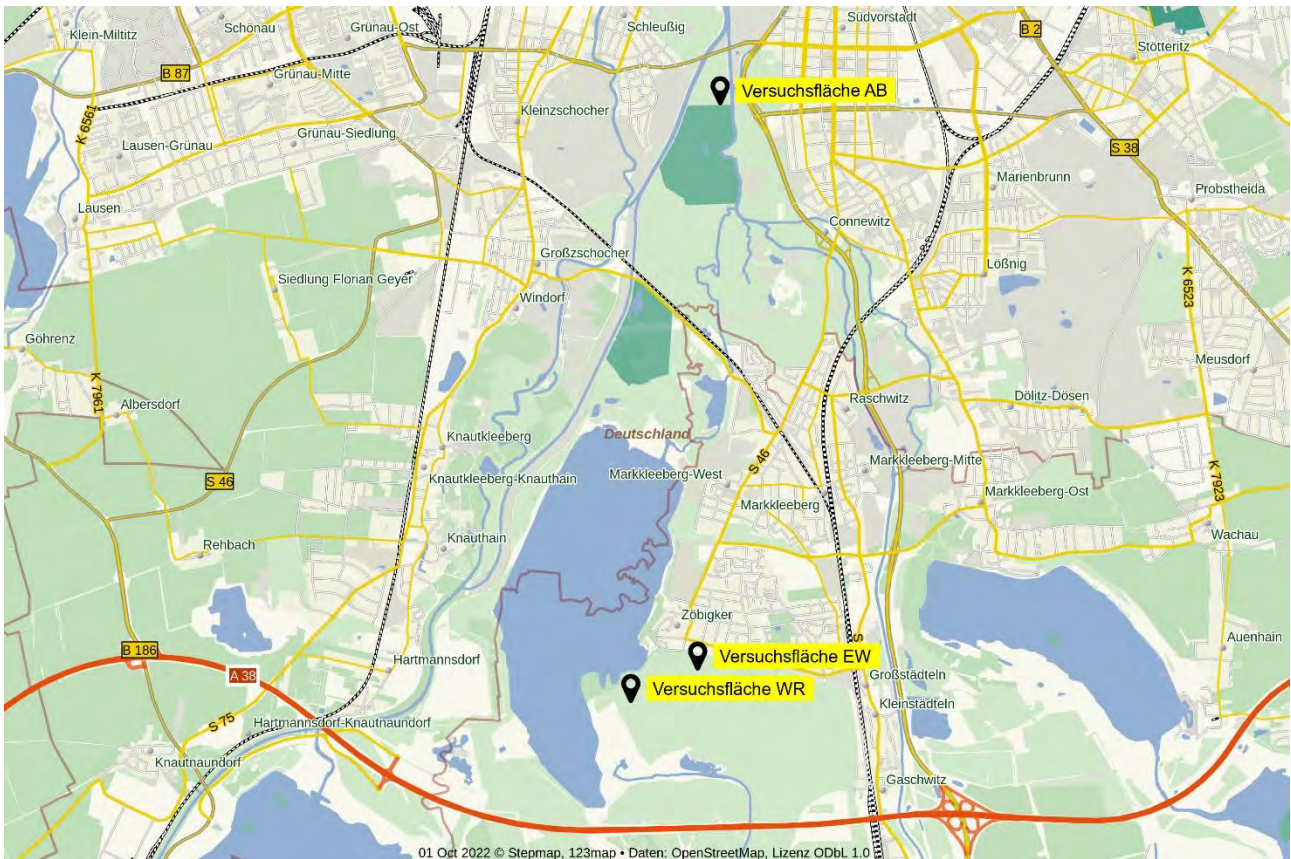


Abbildung 1: Landkarte der Versuchsflächen im Süden Leipzigs und in Markkleeberg



Abbildung 2: Fotografien der Versuchsflächen

3.2 Zeckensammlung

Das Zeckenflaggen wurde einmal pro Monat alle vier Stunden, also sechsmal innerhalb von 24 Stunden, durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein ein Quadratmeter großes, weißes Baumwolltuch, das an einem Bambusstock befestigt war, langsam und flach über die Vegetation gezogen. An jeder Stelle wurde in sechs Reihen von je 100 m² zu unterschiedlichen Tageszeiten geflaggt, also insgesamt 600 m². Die jeweils geflaggt Linien wurden nach dem Zufallsprinzip rotiert, um eine Verzerrung zu vermeiden, wenn immer dieselbe Linie zur selben Zeit geflaggt würde.

Die Beflagung begann um 20:30 Uhr mit Beflagungsintervallen zwischen 20:30 - 22:30, 00:30 - 02:30, 04:30 - 06:30, 08:30 - 10:30, 12:30 - 14:30 und 16:30 – 18:30. Die Versuchsflächen wurden immer in der gleichen Reihenfolge beprobt (zuerst AB, dann EW, dann WR), um den Abstand von etwa vier Stunden zwischen den Beflagungen zu gewährleisten. Zu jedem Zeitpunkt der Probenahme wurden die Temperatur

und die relative Luftfeuchtigkeit etwa 2 cm über dem Boden mit einem tragbaren Thermo hygrometer (Ehdis LH 500, China) gemessen. Außerdem wurden die Lichtverhältnisse notiert (hell, dunkel oder dämmerig). Gesammelte Zecken wurden bei -80 °C für mindestens 3 Tage eingefroren und unter einem Mikroskop (Motic SMZ-171 Stereo-Zoom-Mikroskop, zehnfache Vergrößerung) unter Verwendung von taxonomischen Schlüsseln zur Artbestimmung untersucht (ESTRADA-PEÑA et al. 2018, FILIPPOVA 1997).

3.3 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mit IBM® SPSS Statistics 25 durchgeführt. Die Anzahl der Zecken pro 100 m² wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test verglichen, gefolgt von einem direkten paarweisen Vergleich, wenn der Kruskal-Wallis-Test signifikante Unterschiede ergab. Die Signifikanz wird nach der Bonferroni-Korrektur angegeben. Zur Bewertung des Einflusses von Temperatur und Luftfeuchtigkeit auf die Aktivität der Zecken wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient verwendet.

3.4 Identifizierung der juvenilen Stadien von *D. reticulatus*

Für die Fotografie der Nymphen- und Larvenstadien von *D. reticulatus* wurde ein Keyence VH-900 Mikroskop (Keyence Deutschland GmbH) mit 200-facher Vergrößerung verwendet. Zur Sicherung der korrekten Identifikation als immature Stadien von *D. reticulatus* erfolgten molekulare Analysen. Die DNA-Extraktion wird im Folgenden (3.5.) beschrieben. Das partielle 16S rRNA-Gen wurde nach MANGOLD et al. (1998) amplifiziert (s. Tabelle 1). Das PCR-Produkt mit einer Größe von 320bp wurde in einem einprozentigen Agarosegel dargestellt und anschließend mit dem QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt. Die Sequenzierung des Amplifikationsprodukts erfolgte durch den GATC-Sequenzierservice (Konstanz, Deutschland). Bei der Sequenzierung handelte es sich um eine erhaltene Dienstleistung. Die erhaltene Sequenz wurde mit Bio-Numerics v.7.6 (Applied Maths NV, Austin, Texas, USA) analysiert und mit den in der GenBank verfügbaren Sequenzen mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verglichen. Die Sequenz wurde in die Gen-Bank unter der Zugriffsnummer MT430883 hochgeladen.

3.5 Untersuchung auf Pathogene

Für die DNA-Extraktion zur Untersuchung der immaturren Stadien auf Pathogene wurden die Larven (n = 45) zu zweit in 21 Pools und einem Pool, der aus drei Individuen bestand, gepoolt. Es wurde nur eine der beiden gesammelten Nymphen auf Pathogene untersucht, diese wurde einzeln verarbeitet. Den Zeckenpools wurden 1,6 g sterile Stahlkugeln (Größe 2,8 mm, Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) und 165 µl phosphatgepufferte Kochsalzlösung zugegeben, danach erfolgte eine Homogenisierung in einem Precellys®24 Gewebehomogenisator (Bertin Technologies, Montigny Le Bretonneux, Frankreich) bei 5000 Rotationen pro Minute für 2 × 30 Sekunden, unterbrochen durch eine 15-sekündige Pause. Die DNA wurde mit einem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Die DNA-Proben wurden dann auf die Präsenz von *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp., *Babesia* spp. und *N. mikurensis* untersucht. Die genauen PCR-Protokolle dieser Untersuchungen sind dem Anhang unter 13.1 zu entnehmen. Für *Rickettsia* spp. wurde eine Real-Time-PCR für das *gltA*-Gen [70 Basenpaare (bp)] wie in der Literatur

beschrieben durchgeführt (WÖLFEL et al. 2008). Proben, die sich in der Real-Time-PCR positiv zeigten, wurden mit einer konventionellen PCR weiter untersucht, bei der ein 811-bp-Fragment des ompB-Gens amplifiziert wurde (ROUX und RAOULT 2000). *Bartonella* spp. wurden mit einer konventionellen PCR auf ein Fragment der 16S-23S rRNA ITS-Region untersucht (453-780 bp; (MAGGI et al.). Für *N. mikurensis* wurde eine Real-Time-PCR durchgeführt, die ein 99-bp-Fragment des groEL-Gens nachweisen sollte (JAHFARI et al. 2012, SILAGHI et al. 2012) und für *Babesia* spp. wurde eine konventionelle PCR mit den Primern BJ1 und BN2 durchgeführt, die für den Nachweis des 18S rRNA-Gen verwendet werden (411-452 bp; (CASATI et al. 2006). Eine ausführlichere Liste der verwendeten Primer und PCR-Assays, die zur Identifizierung der juvenilen *D. reticulatus* Stadien und zum Nachweis der Pathogene verwendet wurden, ist in Tabelle 1 zu finden. Alle positiven Proben wurden mit dem NucleoSpin® Gel- und PCR-Aufreinigungskit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt und anschließend kommerziell sequenziert (Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung, Leipzig, Deutschland, erhaltene Dienstleistung). Die Sequenzen (n = 18) wurden in GenBank unter den folgenden Zugriffsnummern hochgeladen: MT434877 bis MT434895.

Da die Larvenproben gepoolt wurden, wird die Prävalenz als die Mindestinfektionsrate (MIR) angegeben, die als das Verhältnis der Anzahl der positiven Pools zur Gesamtzahl der getesteten Zecken definiert ist, ausgehend von der Annahme, dass sich ein infiziertes Individuum in jedem positiven Pool befindet.

Tabelle 1: Details zu Primern und PCR-Untersuchungen für die Speziesidentifikation der juvenilen Stadien von *D. reticulatus* und Detektion von zeckenübertragenen Pathogenen aus den Zecken

Untersuchte Spezies	PCR-Typ	Primernamen	Primer/Sondensequenz (5'-3')	Gen (Amplifikatgröße in Basenpaaren)	Quelle
<i>Dermacentor reticulatus</i>	C		forward CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT reverse GCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGT	Fragment des 16S rRNA-Gens (460)	Mangold et al., 1998
<i>Bartonella</i> spp.	C	Ba325s Ba1100as	CTTCAGATGATGATCCCAAGCCTTCTGGCG GAACCGACGACCCCTGCTTGCAAAGC	16S-23S rRNA (ITS) (453–780)	Maggi et al., 2006
<i>Neoehrlichia mikurensis</i>	RT	NmikGroEL F2 NmikGroEL rev1 NmikGroEL rev2 NmikGroEL- P2a	CCTTGAAAATATAGCAAGATCAGGTAG CCACCACGTAACCTATTTAGCACTAAAG CCACCACGTAACCTATTTAGTACTAAAG FAM- CCTCTACTAATTATTGCTGAAGATGTAGAAGGTGAAGC- BHQ1	groEL (99)	Jahfari et al., 2012; Silaghi et al., 2012
<i>Rickettsia</i> spp.	RT	Pan Rick gltA_2 for Pan Rick gltA_2 rev Pan Rick gltA_3 taq	ATAGGACAACCGTTTATTT CAAACATCATATGCAGAAA 6FAM-CCTGATAATTCGTTAGATTTTACCG-TMR	gltA (70)	Wölfel et al., 2008
<i>Rickettsia</i> spp.	C ^a	120–2788 120–3599	AAACAATAATCAAGGTACTGT TACTTCCGGTTACAGCAAAGT	OmpB (811)	Roux and Raoult, 2000
<i>Babesia</i> spp.	C	BJ1 BN2	GTCTTGTAATTGGAATGATGG TAGTTTATGGTTAGGACTACG	18S rRNA (411–452)	Casati et al., 2006

^a nur durchgeführt, wenn Real-Time-PCR positiv

Abkürzungen: C = konventionelle PCR; RT = Real-Time PCR

4. Ergebnisse

4.1 Gesamtzahl der Zecken

Tabelle 2: Gesamtanzahl der Zeckenarten und -stadien auf den Versuchsflächen

	<i>I. ricinus</i> Weibchen	<i>I. ricinus</i> Männchen	<i>I. ricinus</i> Nymphen	<i>I. ricinus</i> Larven	<i>D.</i> <i>reticulatus</i> Weibchen	<i>D.</i> <i>reticulatus</i> Männchen	<i>D. reticulatus</i> Nymphen ^a	<i>D.</i> <i>reticulatus</i> Larven ^a
AB	86	93	956	30	1	0	0	0
EW	18	16	120	180	5	1	2	26
WR	40	26	31	22	96	45	0	21
Gesamt	144	135	1107	232	102	46	2	47

^a= detaillierte Darstellung der immaturen *D. reticulatus* in Tabelle 4

Insgesamt wurden in 16 Monaten 1.815 Zecken gesammelt. In Tabelle 2 ist die Gesamtzahl der Zecken in den verschiedenen Gebieten angegeben. Die juvenilen *D. reticulatus*-Zecken sind im Abschnitt 4.6 und Tabelle 4 weiter aufgeschlüsselt. In dieser Studie zeigte sich, dass der Lebensraum einen starken Einfluss auf die Gesamtzahl der Zecken und auch die Verhältnisse der verschiedenen Zeckenspezies hat. Während auf der Fläche AB die meisten Adulten und Nymphen von *I. ricinus* und nur eine einzige *D. reticulatus* gesammelt werden konnten, wurden auf der Versuchsfläche WR die meisten *D. reticulatus*-Zecken gesammelt. Auf der EW- und der WR-Versuchsfläche konnten mehrfach juvenile Stadien von *D. reticulatus* geflaggt werden. Die Fläche EW zeigte jedoch insgesamt geringe Zeckenzahlen. Auf der Fläche WR zeigte sich die Zahl der *I. ricinus* Nymphen im Vergleich zu den Adulten als außergewöhnlich gering.

Die Larven von *I. ricinus* sowie die Larven und Nymphen von *D. reticulatus* wurden für die statistischen Analysen der Zeckenaktivität ausgeschlossen, da die Larven aus großen Eipaketen schlüpfen und daher gehäuft und nicht gleichmäßig verteilt auftreten. Die *D. reticulatus*-Nymphen wurden aufgrund der geringen Anzahl ausgeschlossen.

In Abbildung 3 wird deutlich, dass bei *I. ricinus* an den beiden bewaldeten Standorten AB und EW ein deutlich höherer Anteil an Nymphen als adulte Männchen und Weibchen an der Gesamtzahl der geflaggt Zecken vorliegt. Die Verhältnisse an den beiden Standorten ähneln sich sehr. Davon deutlich abweichend zeigt sich die Versuchsfläche WR, auf der alle drei Gruppen in ähnlich großen Anteilen vertreten sind.

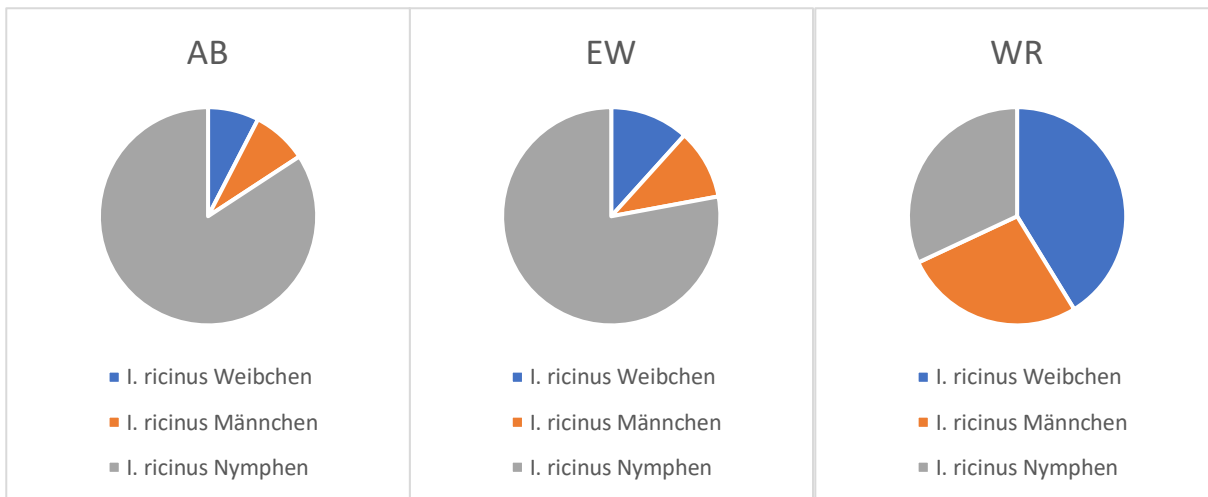


Abbildung 3: Anteile der einzelnen Entwicklungsstadien von *I. ricinus* an der Gesamtanzahl von *I. ricinus*, aufgeschlüsselt nach Versuchsfeld

Vergleichend zwischen den verschiedenen Standorten zeigte sich für *I. ricinus* Männchen und Weibchen eine signifikant höhere Aktivität auf Versuchsfeld AB im Vergleich zur den Flächen EW und WR (Kruskal-Wallis Test, $P=0,000$ für sowohl Weibchen als auch Männchen vergleichend zwischen AB mit sowohl WR als auch EW). Die Aktivität der Männchen und Weibchen zwischen den Flächen EW und WR zeigte keine signifikanten Unterschiede (jeweils $P=1,0$).

Bei den Nymphen von *I. ricinus* zeigten sich für alle Versuchsfelder signifikante Unterschiede der Aktivität. Die Aktivität war auf der Versuchsfeld AB am höchsten und auf der Fläche WR am niedrigsten (Kruskal-Wallis Test, $P=0,000$ bei Vergleichen zwischen AB mit WR und AB mit EW, $P=0,001$ bei Vergleichen zwischen EW und WR).

Da *D. reticulatus* nur auf Versuchsfeld WR in mehr als einstelligen Zahlen vorkam, wurde hier auf statistische Vergleiche zwischen den Versuchsfeldern verzichtet.

4.2 Saisonale Aktivitätsmuster

In Abbildung 4 wird die Aktivität von *I. ricinus*-Zecken auf der Versuchsfeld AB nach Monaten aufgeschlüsselt dargestellt. Die höchste monatliche Gesamtaktivität von Nymphen und Adulten wurde im Mai 2019 beobachtet. Im Februar 2019 konnten an Versuchsfeld AB keine *I. ricinus*-Zecken geflaggt werden, so dass in diesem Monat die geringste Aktivität festgestellt wurde. Es zeigte sich ein bimodales Verteilungsmuster mit hohen Aktivitäten im Frühling und einer etwas geringeren Aktivität im Spätsommer bis Herbst, getrennt durch ein Tief im Sommer. Nach dem September fielen die Zeckenzahlen in beiden Jahren deutlich ab, die Aktivität im November und Februar war sehr gering.

Da das Flaggen im Sommer und Herbst von zwei Jahren des Versuchszeitraums (2018 und 2019), im Frühling jedoch nur in einem Jahr (2019) durchgeführt wurde, können die absoluten Zeckenzahlen zwischen den

verschiedenen Jahreszeiten nicht verglichen werden. Dies gilt auch für die nachfolgenden Analysen der beiden anderen Versuchsflächen.

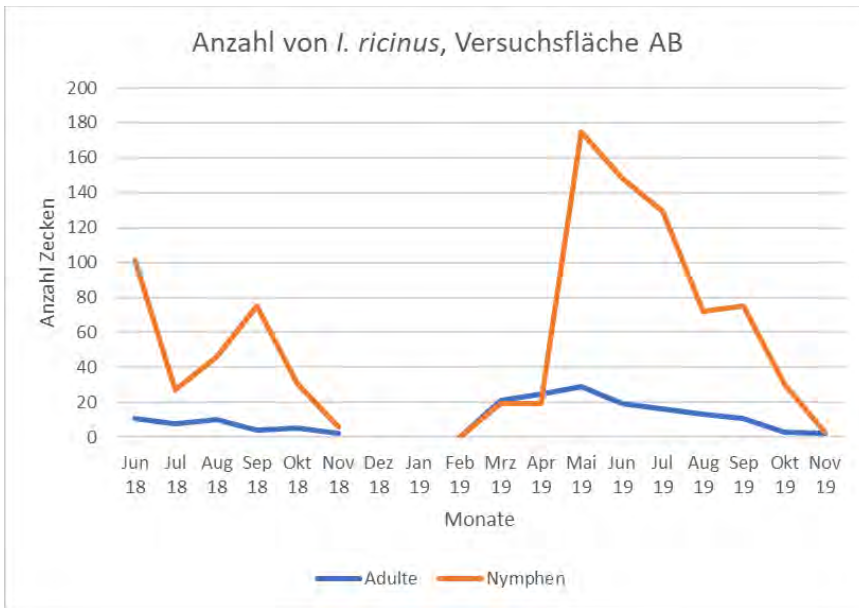


Abbildung 4: Zeckenzahlen über den Versuchszeitraum auf Versuchsfläche AB

Auf der Versuchsfläche EW waren die Zahlen von sämtlichen Stadien von *I. ricinus* deutlich geringer als auf der Versuchsfläche AB. Die bimodale Verteilung ließ sich hier nur bedingt feststellen, das Aktivitätsmaximum im Frühjahr bei den Nymphen war sehr hoch im Vergleich zur Aktivität über den Rest des Jahres (Abbildung 5).

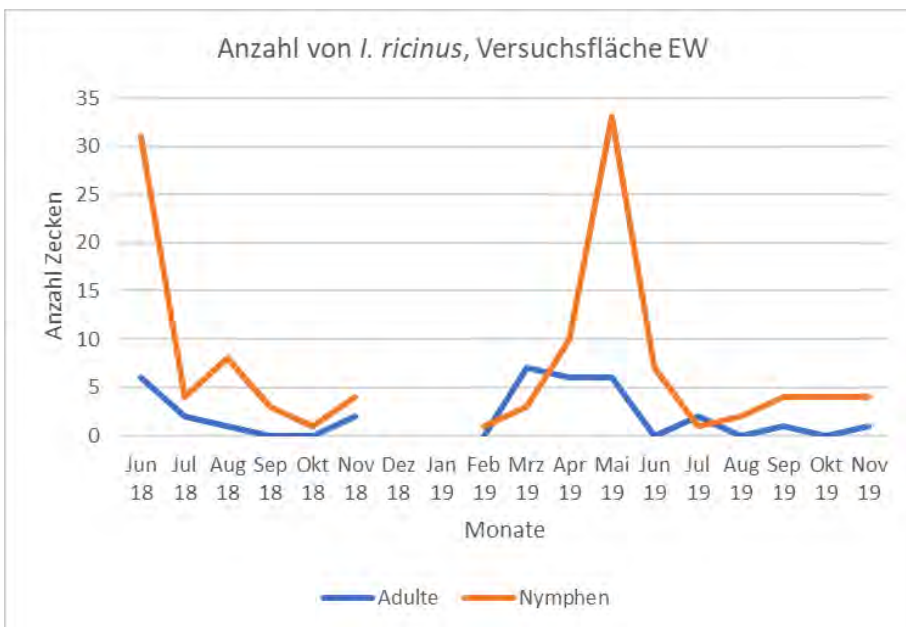


Abbildung 5: Zeckenzahlen über den Versuchszeitraum auf Versuchsfläche EW

Auf Versuchsfläche WR konnten *I. ricinus* und *D. reticulatus* geflaggt werden. Die *I. ricinus*-Nymphen zeigten keine klaren Aktivitätsmaxima. Bei den Adulten war eine Aktivitätsspitze im Frühjahr festzustellen.

D. reticulatus zeigte ein bimodales Aktivitätsmuster mit höherer Spitze im Frühjahr und niedrigerer Spitze im Herbst (Abbildung 6).

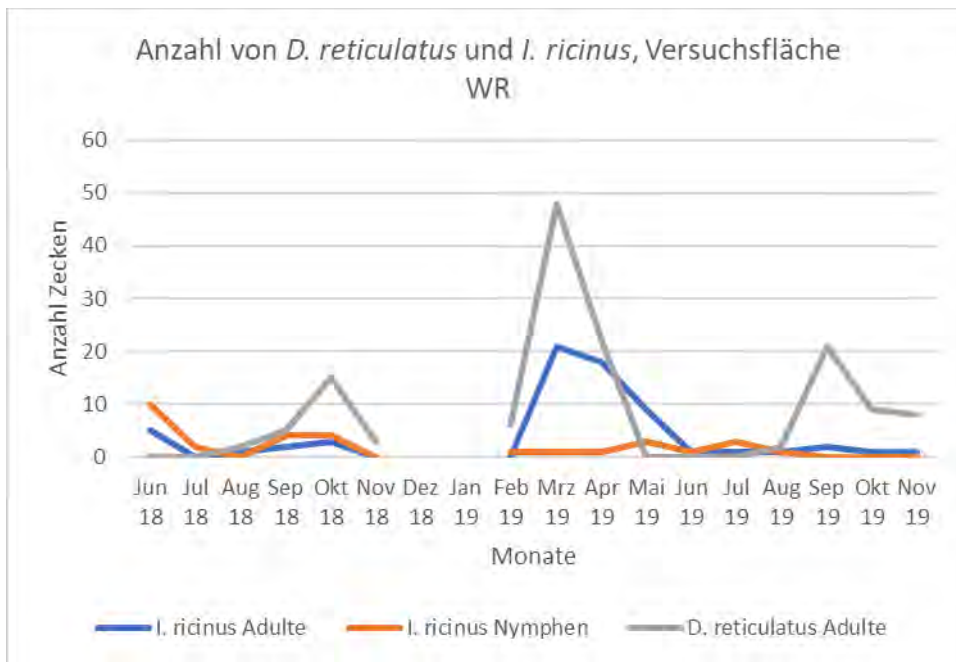


Abbildung 6: Zeckenzahlen über den Versuchszeitraum auf Versuchsfläche WR

4.3 Diurnale Aktivitätsmuster

Aus Abbildung 7 ist ersichtlich, dass die Aktivität der *I. ricinus*-Nymphen auf der Versuchsfläche AB in der Zeit von 00:30 – 02:30 Uhr am höchsten und in der Zeit von 20:30 – 22:30 Uhr am niedrigsten war. Die Aktivität der erwachsenen *I. ricinus*-Zecken war insgesamt deutlich geringer als die der Nymphen, aber um 00:30 – 02:30 Uhr immer noch am höchsten. Die niedrigsten Aktivitäten bei den Weibchen konnten im Intervall von 8:30 – 10:30 und bei den Männchen sowohl im Intervall von 20:30 – 22:30 als auch 04:30 – 06:30 mit identischen Werten festgestellt werden.

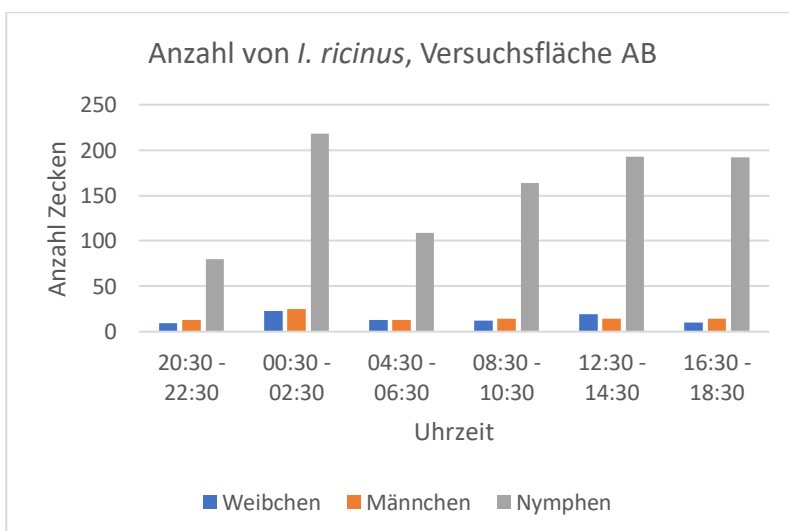


Abbildung 7: Aktivität von *I. ricinus* auf Versuchsfläche AB nach Tageszeiten

Auf Versuchsfläche EW wurde die geringste Aktivität von *I. ricinus*-Nymphen in der Zeit zwischen 20:30 und 22:30 Uhr festgestellt, gefolgt von einer steigenden Aktivität, die ihren Höhepunkt in der Zeit zwischen 04:30 und 06:30 Uhr erreichte. Danach nahm die Aktivität bis zur Zeitspanne von 12:30 – 14:30 Uhr ab, bis sie in der Zeitspanne von 16:30 – 18:30 Uhr wieder anstieg. Die Aktivität der Weibchen war um 04:30 – 06:30 Uhr am höchsten und um 00:30 – 02:30 Uhr am niedrigsten. Männliche *I. ricinus* waren um 20:30 – 22:30 und 08:30 – 10:30 Uhr am aktivsten und um 16:30 – 18:30 Uhr am wenigsten aktiv (Abbildung 8).

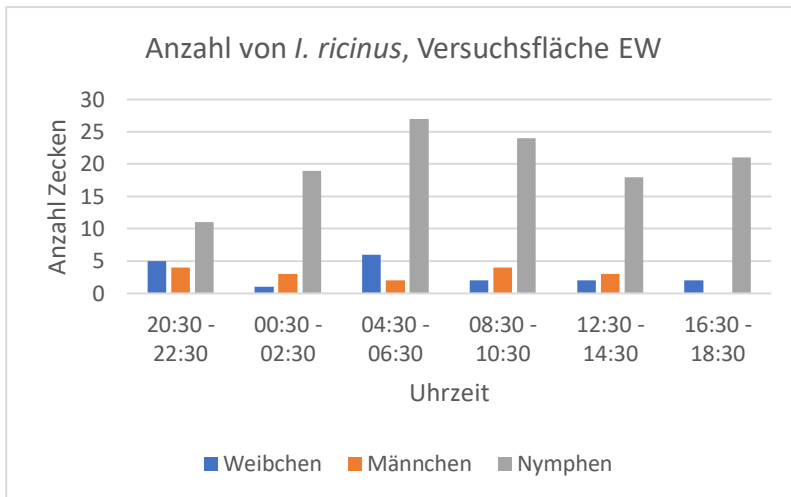


Abbildung 8: Aktivität von *I. ricinus* auf Versuchsfläche EW nach Tageszeiten

Versuchsfläche WR war die einzige Versuchsfläche mit erheblicher *D. reticulatus*-Aktivität. Wie in den Abbildungen 9 und 10 zu sehen ist, war die Aktivität von *D. reticulatus* in den meisten Zeitintervallen höher als die von *I. ricinus*. Weibliche *D. reticulatus* waren in jedem Zeitintervall aktiver als männliche. Bei den adulten Stadien von *D. reticulatus* war die höchste Aktivität zwischen 00:30 und 02:30 Uhr zu verzeichnen, ebenso wie bei beiden adulten Stadien von *I. ricinus*. *D. reticulatus*-Adulte waren zwischen 20:30 und 22:30 Uhr am wenigsten aktiv, während *I. ricinus*-Weibchen zwischen 20:30 und 22:30 Uhr sowie zwischen 12:30 und 14:30 Uhr mit identischen Zeckenzahlen am wenigsten aktiv waren. Zwischen 08:30 und 10:30 Uhr sowie zwischen 12:30 und 14:30 Uhr konnten keine *I. ricinus*-Männchen geflaggt werden, so dass in diesen Zeiträumen die geringste männliche Aktivität zu verzeichnen war. Bei den *I. ricinus*-Nymphen wurde die höchste Aktivität in der Zeit von 04:30 – 06:30 Uhr und die geringste in der Zeit von 00:30 – 02:30 Uhr beobachtet.

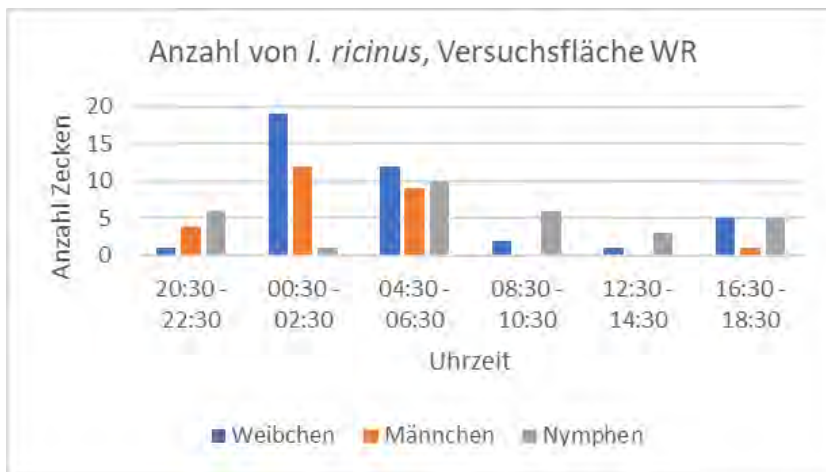


Abbildung 9: Aktivität von *I. ricinus* auf Versuchsfläche WR nach Tageszeiten

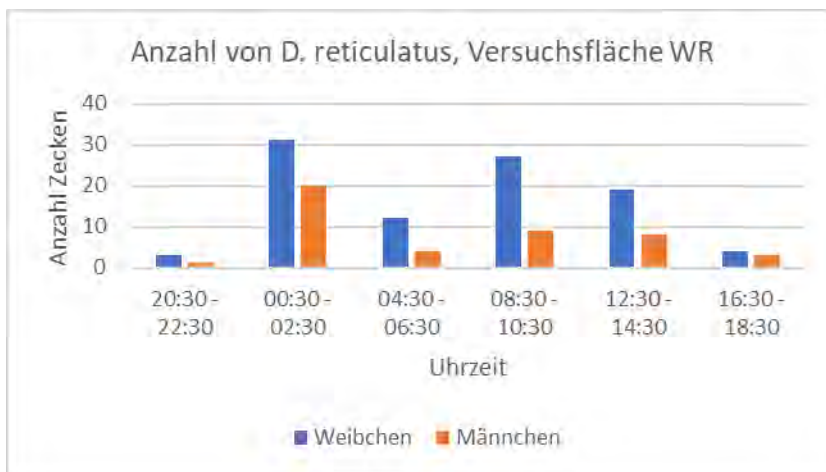


Abbildung 10: Aktivität von *D. reticulatus* auf Versuchsfläche WR nach Tageszeiten

Bei den Zeitintervallen konnte für keine der Zeckenarten oder Lebensstadien ein signifikanter Unterschied in der Zeckenaktivität festgestellt werden, wenn die Daten für alle drei Versuchsflächen kombiniert wurden. Bei separater Betrachtung der verschiedenen Versuchsflächen zeigte lediglich Fläche WR signifikante Unterschiede für die Zeitintervalle und dies ausschließlich für *I. ricinus*-Weibchen. Diese signifikanten Unterschiede wurden beim Vergleich der Zeckenzahlen des Flaggingintervalls von 20:30 – 22:30 Uhr mit dem Intervall von 00:30 – 02:30 Uhr ($P=0,043$) und beim Vergleich der Zeckenzahlen des Flaggingintervalls von 12:30 – 14:30 Uhr mit denen des Flaggingintervalls von 00:30 – 02:30 Uhr ($P=0,043$) mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests und eines direkten paarweisen Vergleichs festgestellt.

4.4 Einfluss der Lichtverhältnisse auf die Zeckenaktivität

Um zu untersuchen, ob die Lichtverhältnisse eine Rolle für die Aktivität von *D. reticulatus* und *I. ricinus* spielen, wurden die Daten erneut mit einem Kruskal-Wallis-Test und einem paarweisen Vergleich analysiert. Bei der Kombination der Zeckenzahlen aller Versuchsflächen für die verschiedenen Arten und Stadien konnten für die Aktivität von *I. ricinus*-Weibchen signifikante Unterschiede zwischen Dunkelheit und Dämmerung ($P=0,042$) und Licht und Dämmerung ($P=0,050$), jedoch nicht zwischen Dunkelheit und Tageslicht festgestellt werden. Bei den *I. ricinus*-Männchen ergab der Vergleich von Tageslicht und Dämmerung signifikante Unterschiede ($P=0,010$), die anderen Lichtverhältnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede. Bei *I. ricinus*-

Nymphen war der Unterschied der Aktivität zwischen Dunkelheit und Tageslicht signifikant ($P=0,030$), der Unterschied der Aktivität zwischen anderen Lichtverhältnissen jedoch nicht. Bei den Männchen und Weibchen von *D. reticulatus* konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Aktivitäten bei verschiedenen Lichtverhältnissen festgestellt werden.

Bei der getrennten Betrachtung der verschiedenen Versuchsflächen wurden *D. reticulatus*-Zecken nur an Versuchsfläche WR in die Analyse mit einbezogen, da auf den anderen Versuchsflächen nur einzelne Exemplare geflaggt wurden. An Versuchsfläche AB konnten für die adulten Stadien von *I. ricinus* keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Bei den *I. ricinus*-Nymphen konnten signifikante Unterschiede in der Aktivität zwischen Dunkelheit und Tageslicht festgestellt werden ($P=0,027$). Auf der Versuchsfläche EW wurden die einzigen signifikanten Unterschiede bei weiblichen *I. ricinus*-Zecken festgestellt. Bei ihnen zeigten sich sowohl zwischen Dunkelheit und Dämmerung als auch zwischen Tageslicht und Dämmerung signifikante Unterschiede (jeweils $P=0,000$). An der Versuchsfläche WR war nur der Unterschied zwischen Tageslicht und Dunkelheit für *I. ricinus*-Männchen signifikant ($P=0,011$).

Um festzustellen, ob es Unterschiede in der Reaktion auf Licht in den verschiedenen Jahreszeiten gibt, wurden die Monate März bis Mai als Frühling, Juni bis August als Sommer und September bis November als Herbst betrachtet. Der Februar wurde bei dieser Analyse nicht berücksichtigt, da er eine sehr geringe Zeckenzahl aufwies, in der Regel der hier nicht berücksichtigten Jahreszeit „Winter“ zugesprochen wird und damit jede Jahreszeit zur besseren Vergleichbarkeit aus drei Monaten besteht. Im Frühjahr zeigten nur die Männchen von *I. ricinus* einen signifikanten Unterschied in der Aktivität zwischen Tageslicht und Dämmerung ($P=0,037$). Im Sommer wiesen nur die Männchen von *D. reticulatus* signifikante Unterschiede zwischen Tageslicht und Dunkelheit auf ($P=0,042$). Im Herbst wurde der einzige signifikante Unterschied zwischen Tageslicht und Dunkelheit bei den Nymphen von *I. ricinus* festgestellt ($P=0,007$).

Obwohl viele Vergleiche keine signifikanten Unterschiede ergaben, ist aus Tabelle 3 ersichtlich, dass die durchschnittliche Zeckenzahl pro 100 m² Flaggstrecke für alle *I. ricinus*-Stadien in der Dämmerung höher war als bei Tageslicht und Dunkelheit. Bei den adulten Stadien war die durchschnittliche Zeckenzahl in der Dämmerung sogar mehr als doppelt so hoch wie in der Dunkelheit. Die durchschnittlichen Zeckenzahlen für adulte *I. ricinus* waren bei Dunkelheit und Tageslicht ähnlich. Auch die Nymphen von *I. ricinus* wiesen die höchsten durchschnittliche Zeckenzahl in der Dämmerung auf, jedoch waren hier die durchschnittlichen Zeckenzahlen bei Tageslicht wesentlich höher als bei Dunkelheit. Bei *D. reticulatus* war ein deutlich anderes Muster zu erkennen. Die mittlere Zeckenzahl der Weibchen war in der Dämmerung am niedrigsten und in der Dunkelheit am höchsten. Bei den Männchen waren die mittleren Zeckenzahlen in der Dämmerung und im Hellen sehr ähnlich, während sie in der Dunkelheit etwas höher waren.

Tabelle 3: Vergleich der durchschnittlichen Zeckenzahlen bei verschiedenen Lichtbedingungen

	Durchschnittliche Anzahl <i>I. ricinus</i> -Weibchen	Durchschnittliche Anzahl <i>I. ricinus</i> -Männchen	Durchschnittliche Anzahl <i>I. ricinus</i> -Nymphen	Durchschnittliche Anzahl <i>D. reticulatus</i> -Weibchen	Durchschnittliche Anzahl <i>D. reticulatus</i> -Männchen
Dunkelheit	0.49	0.53	2.85	0.41	0.20
Dämmerung	0.89	0.82	5.41	0.25	0.14
Tageslicht	0.43	0.36	4.33	0.33	0.13

4.5 Einfluss von relativer Luftfeuchte und Temperatur

Die an der Versuchsfläche AB gemessenen Temperaturen schwankten zwischen -1 °C im Februar 2019 im Zeitintervall von 00:30 – 02:30 Uhr (keine Zecken aufzufinden) und 32 °C im Juli 2018 im Zeitintervall von 20:30 – 22:30 Uhr. An dieser Maximaltemperatur konnten mehrere *I. ricinus*-Zecken geflaggt werden (ein Männchen, ein Weibchen, drei Nymphen). Die niedrigste gemessene relative Luftfeuchtigkeit dieser Versuchsfläche war 31 % im Zeitintervall von 16:30 – 18:30 Uhr im April 2019, die höchste relative Luftfeuchtigkeit wurde mit 84 % im Oktober 2019 in der Zeit zwischen 00:30 und 02:30 Uhr gemessen. An der Versuchsfläche EW wurde die niedrigste Temperatur ebenfalls im Februar 2019 mit -1,5 °C gemessen, das Flaggen zu diesem Zeitpunkt blieb erfolglos, und die höchste Temperatur im Juli 2018 mit 32 °C sowohl im Intervall von 20:30 – 22:30 Uhr als auch im Intervall von 16:30 – 18:30 Uhr, wobei eine Nymphe und zwei Weibchen geflaggt werden konnten. Die relative Luftfeuchtigkeit lag an dieser Versuchsfläche zwischen 20 % in der Zeit von 12:30 – 14:30 Uhr im April 2019 und 87 % im November 2019 in der Zeit von 00:30 – 02:30 Uhr. An der Versuchsfläche WR wurde als niedrigste Temperatur -2 °C mit Bodenfrost gemessen und es wurden zu diesem Zeitpunkt zwei Weibchen und ein Männchen von *D. reticulatus* gesammelt. Die höchste Temperatur wurde an dieser Versuchsfläche mit 33 °C im April 2019 in der Zeit von 12:30 – 14:30 Uhr aufgezeichnet, was die insgesamt höchste Temperatur des Feldversuchs darstellte. Bei diesen Bedingungen konnten drei *D. reticulatus*-Weibchen geflaggt werden. Bei dieser Aufzeichnung lag die Stelle im vollen Sonnenlicht und die Temperaturmessung wurde in der Sonne durchgeführt. Die relative Luftfeuchtigkeit an dieser Stelle lag zwischen 12 % (gemessen zur gleichen Zeit und unter den gleichen Bedingungen wie die 33 °C-Messung) und 91 % im November 2019 im Intervall 16:30 – 18:30 Uhr. Die insgesamt niedrigste Temperatur, bei der *I. ricinus*-Zecken gesammelt werden konnten, lag im März 2019 zwischen 04:30 und 06:30 Uhr an der Versuchsfläche EW bei 2 °C.

Um den Einfluss von Temperatur und relativer Temperatur auf die Aktivität der Zecken zu bewerten, wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient verwendet. Bei zusammengeführten Zeckenzahlen aus allen Versuchsflächen konnte eine Korrelation zwischen der Anzahl der *I. ricinus*-Nymphen und der Temperatur (Pearson-Korrelationskoeffizient $r=0,201$; $P=0,001$) sowie zwischen den *D. reticulatus*-Weibchen und -Männchen und der Temperatur (Pearson-Korrelationskoeffizient $r=-0,169$; $P=0,005$ bzw. $-0,131$; $P=0,030$) festgestellt werden.

Bei separater Betrachtung der verschiedenen Versuchsflächen konnten folgende Korrelationen festgestellt werden: Für Versuchsfläche AB konnte eine Korrelation zwischen der Anzahl der *I. ricinus*-Weibchen und der Temperatur (Pearson-Korrelationskoeffizient $r=0,209$; $P=0,041$) sowie zwischen *I. ricinus*-Nymphen und der Temperatur (Pearson-Korrelationskoeffizient $r=0,398$; $P=0,000$) festgestellt werden. Für EW konnten keine signifikanten Korrelationen gefunden werden. Für WR bestand die einzige signifikante Korrelation zwischen *D. reticulatus*-Weibchen und Temperatur (Pearson-Korrelationskoeffizient $r=-0,259$; $P=0,016$). Interessanterweise konnte für die relative Luftfeuchte keine signifikante Korrelation zu einem Zeckenstadium oder einer -art gefunden werden.

4.6 Juvenile Stadien von *D. reticulatus*

Insgesamt konnten 47 Larven und zwei Nymphen von *D. reticulatus* durch die Flaggmethode an der Bodenoberfläche oder Vegetation gesammelt werden. Die Larven wurden im Sommer (Juni 2018 sowie Juni und Juli 2019) an den Standorten WR und EW gesammelt, während Nymphen nur einmalig im Juli 2019 an der EW-Fläche gefunden wurden (Tabelle 4). Alle gesammelten Larven (Abb. 11) und Nymphen (Abb. 12) wurden aufgrund morphologischer Merkmale als *D. reticulatus* identifiziert.

Tabelle 4: Umweltdaten der Funde von juvenilen Stadien von *D. reticulatus*

Fläche	Datum	Tageszeit	Zahl gesammelter		Temperatur (°C)	Relative Luftfeuchte	Wetterbedingungen
			<i>D. reticulatus</i> Nymphen	Larven			
	19. Juni 2018	17:30	0	6	25.0	NDA	bewölkt
	21. Juni 2019	09:30	0	8	19	NDA	NDA
	26. Juni 2019	21:30	0	9	29	53.3 %	wolkenlos
Eichenwald (EW)	27. Juni 2019	05:45	0	3	19.2	68.3 %	wolkenlos
	27. Juni 2019	14:00	0	1	29.8	25.5 %	sonnig
	27. Juni 2019	17:30	0	6	28.2	29.5 %	NDA
	23. Juli 2019	09:30	1	0	24.3	62.7 %	sonnig

	23. Juli 2019	13:45	1	1	30.3	45.5 %	sonnig
	Gesamt		2	26			
	19. Juni 2018	18:00	0	15	25	NDA	bewölkt
Wegrand (WR)	26. Juni 2019	22:05	0	5	28.6	54.0 %	Dämmerung
	27. Juni 2019	06:15	0	1	19.6	67.5 %	Bewölkt, windig
	Gesamt		0	21			

NDA – keine Daten vorliegend



Abbildung 11: ventrale und dorsale Ansicht einer der geflagten *D. reticulatus*-Larven



Abbildung 12: ventrale und dorsale Ansicht einer der geflaggtten *D. reticulatus*-Nymphen

In der Publikation im Anhang befinden sich zusätzlich Aufnahmen der geflaggtten *D. reticulatus*-Larven mittels konfokaler Lasermikroskopie, auf die jedoch in dieser Dissertation nicht weiter eingegangen wird, da es sich hierbei um einen Publikationsanteil ohne signifikanten Eigenanteil handelt.

Die Sequenz der 16S rRNA-Gene der in dieser Studie untersuchten Zecke (GenBank Zugriffsnummer MT430883) zeigte hundertprozentige Identität mit *D. reticulatus*-Zecken (Zugriffsnummer KC427891).

Die Mindestinfektionsrate der Larven für *Rickettsia* spp. betrug 42,2 % (Real-Time-PCR: 18 von 22 Larvenpools positiv, ompB-konventionelle PCR: 17 Larvenpools positiv). Die eine getestete Nymphe war ebenfalls in beiden PCRs positiv. Die Sequenzierung zeigte das Vorhandensein von *R. raoultii* in allen konventionellen PCR positiven Larvenpools sowie in der Nymphe. Alle erhaltenen Sequenzen (n=18) zeigten hundertprozentige Identität mit GenBank Zugriffsnummer MG811717. Alle Proben wurden negativ auf die anderen Erreger getestet.

5. Diskussion

In der hier vorliegenden Studie wurden mittels Flaggmethode über eineinhalb Jahre hinweg monatlich in sechs über den Tag verteilten Zeitintervallen Zecken an drei verschiedenen Standorten gesammelt. Das Ziel war eine Aussage über Aktivitätsmuster im Tagesrhythmus, entweder durch Aktivitätsmuster im 24-Stunden-Rhythmus oder im Zusammenhang mit Licht, Dunkelheit und Dämmerung treffen zu können. Zudem sollte der Einfluss von Temperatur und Luftfeuchtigkeit überprüft werden. Diese Untersuchungen wurden, teils vergleichend, auf drei verschiedenen Versuchsflächen durchgeführt.

Dabei fielen Unterschiede in der Zeckenaktivität auf. Adulte und Nymphen von *I. ricinus* waren auf der Versuchsfläche AB deutlich aktiver als auf den beiden anderen, was bedeutet, dass der alte Auwald bei Versuchsfläche AB ein geeigneterer Lebensraum für sie zu sein scheint, als die junge Eichenplantage von Versuchsfläche EW oder die Wiese am Wegesrand von Versuchsfläche WR. Diese höhere Aktivität von *I. ricinus*-Zecken in Auwäldern im Vergleich zu Lichtungen wird auch in anderen Studien beschrieben (SCHULZ et al. 2014). Adulte *D. reticulatus* konnten auf der Versuchsfläche WR in größerer Anzahl angetroffen werden; auf den anderen Versuchsflächen jedoch nur einzelne Exemplare. Obwohl eine Präferenz von *D. reticulatus* für offene Wiesenhabitate in der Literatur beschrieben wird, analog zu den Beobachtungen der hier vorgestellten Studie, gibt es auch gegenteilige Beobachtungen, in denen feuchte Habitate wie Auwälder bevorzugt werden (FÖLDVÁRI et al. 2016). Dies konnte an den hier untersuchten Orten nicht bestätigt werden. Denn im Habitat mit der höchsten relativen Luftfeuchtigkeit und der größten Nähe zu einem Gewässer, die Versuchsfläche AB, konnte im gesamten Untersuchungszeitraum nur eine einzige *D. reticulatus*-Zecke geflaggt werden.

Eine Benutzung der Daten der CORINE-Bodenbedeckungsklassifikation zur Auswahl und zum Vergleich von Zeckenhabitaten wird häufig in der Literatur beschrieben (UUSITALO et al. 2022, JUNG KJÆR et al. 2019, WONGNAK et al. 2022). Da Lebensräume mit deutlichen Unterschieden in der Ökologie und der Zeckenaktivität immer noch in dieselbe CORINE-Landklasse fallen können, ist bei der Verwendung von CORINE-Daten Vorsicht geboten. So ist beim Vergleich der Versuchsflächen in der dieser Dissertation zugrunde liegenden Studie auffällig, dass sie zwar alle nach der CORINE-Bodenbedeckungsklassifikation als "Laubwald" eingestuft sind, aber erhebliche Unterschiede in der Vegetation sowie bei Temperatur und Luftfeuchtigkeit aufweisen. Diese Diskrepanz zwischen der CORINE-Klassifizierung und den In-situ-Bedingungen kann eine Datenbereinigung notwendig machen (BRUGGER et al. 2016). Eine Besichtigung der Vegetation vor Ort zur Beurteilung der Vergleichbarkeit sowie das Meiden von Randbereichen und fragmentierten Flächen erscheint angeraten. Fragmentierte Habitate sollten darüber hinaus ebenfalls vermieden werden, da in ihnen einzelne Flächen trotz gleicher abiotischer Bedingungen rein durch ihre Lagebeziehung zu anderen Flächen eine andere Zeckenabundanz aufweisen können (ESTRADA-PEÑA 2002).

Bei *I. ricinus* zeigte sich in dieser Studie, dass sich auf der Versuchsfläche WR das Verhältnis von adulten Tieren zu Nymphen stark von den anderen beiden Versuchsflächen unterschied. Auf Versuchsfläche WR war die Zahl der Weibchen und Männchen zusammengenommen mehr als doppelt so hoch wie die der Nymphen, während auf den Versuchsflächen AB und EW die Zahl der Nymphen die Zahl der Adulten um ein Vielfaches überstieg. Ein deutlich höherer Anteil von Nymphen im Vergleich zu Adulten, wenn auch mit Fluktuationen von Jahr zu Jahr, scheint den Normalzustand darzustellen. Dabei hängt das Verhältnis von den meteorologischen Bedingungen sowie der Verfügbarkeit von Wirten für die Nymphen ab (DANIEL et al. 2015, DANIEL et al. 2004, HÖNIG et al. 2015). Das hier vorliegende ungewöhnliche Verhältnis könnte damit erklärt werden, dass Nymphen aufgrund ihres schlechteren Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen und ihres geringeren Fettgehalts empfindlicher gegenüber Austrocknung sind als die adulten Stadien und darum an diesem sehr trockenen und exponierten Standort nur einer limitierten Wirtssuchaktivität nachkommen können (HERRMANN und GERN 2010). Insgesamt konnten in der hier vorliegenden Studie auf der Versuchsfläche AB mehr Männchen als Weibchen von *I. ricinus* gesammelt werden, was in anderen Studien damit erklärt wird, dass Männchen längere Zeit auf der Vegetation verbringen als Weibchen, um sich mehrmals paaren zu können (DANIEL et al. 2015). Dieser Trend zeigte sich jedoch nicht auf den anderen beiden Versuchsflächen, an denen sogar mehr Weibchen als Männchen geflaggt werden konnten. Dies könnte damit erklärt werden, dass an den anderen beiden Standorten die Überlebensbedingungen für *I. ricinus* schlechter waren, aber die Weibchen die Wirtssuche dennoch aufrechterhielten, da eine Blutmahlzeit für sie zur Eiablage obligat ist.

Die saisonale Aktivität von *I. ricinus* zeigt je nach Studienort und -jahr ein uni- bis bimodales Muster mit einem Aktivitätsmaximum im Frühjahr, einer geringeren Aktivität im Sommer, und bei einem bimodalen Muster gefolgt von einem erneuten Anstieg im Herbst und schließlich einem deutlichen Abfall zum Winter hin (DANIEL et al. 2015, SCHULZ et al. 2014, RANDOLPH et al. 2002). In der hier vorgestellten Studie konnte auf der Versuchsfläche AB im Jahr 2019 nur ein eher gering ausgeprägter zweiter Aktivitätsanstieg der *I. ricinus*-Nymphen im Herbst beobachtet werden. Bei den Adulten entfiel er 2019 komplett. Im Jahr 2018, das leider aufgrund des Versuchsstarts im Juni nicht in seiner kompletten Saisonalität beurteilt werden konnte, zeigte das saisonale Muster einen ausgeprägteren Tiefpunkt im Hochsommer mit darauffolgendem Anstieg. Auf der Versuchsfläche EW zeigte sich ein sehr ausgeprägtes Aktivitätsmaximum der Nymphen im Frühjahr, jedoch nur ein geringer herbstlicher Aktivitätsanstieg. Bei den Adulten zeigte sich im Jahr 2019 ein bimodales Aktivitätsmuster, im Jahr 2018 entfiel der Aktivitätsanstieg im Herbst jedoch komplett. Dies stimmte mit den Ergebnissen anderer mehrjähriger Studien überein, die nicht in jedem Jahr eine bimodale Aktivitätsverteilung bei *I. ricinus* beobachten konnten (BRUGGER et al. 2017, DANIEL et al. 2004). Zudem kann in kühleren Klimazonen vermehrt ein unimodales Aktivitätsmuster festgestellt werden (WONGNAK et al. 2022). Manchmal kann sogar eine Aktivität mit drei Maxima beobachtet werden, bei der das letzte Aktivitätsmaximum ähnlich dem zweiten Maximum in der hier vorgestellten Studie im September liegt (DANIEL et al. 2015). Zudem gibt es in Studien, die mehrere Jahre beobachten, signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Jahren, vermutlich aufgrund unterschiedlicher Wetterbedingungen oder schwankenden Wirtsangebot (DANIEL et al. 2015). Auf Versuchsfläche WR konnte bei *I. ricinus* kein klares

Aktivitätsmuster mit deutlichen Maxima festgestellt werden. Dies lag vermutlich an den geringen Gesamtzahlen von *I. ricinus* auf dieser Fläche. Ob es ein unimodales oder bimodales Aktivitätsmuster an einem Standort gibt, scheint von der Niederschlagsmenge sowie der Vegetation abzuhängen (SCHULZ et al. 2014).

D. reticulatus zeigte ein ebenfalls bimodales Aktivitätsmuster, im Vergleich zu *I. ricinus* jedoch verschoben mit den beiden Aktivitätshöhepunkten früher im Frühjahr und später im Herbst. Es zeigte sich eine hohe Aktivitätsspitze im Frühjahr, ein Sommer ohne jegliche Aktivität, gefolgt von einer kleineren Spitze im Herbst. Dies steht im Gegensatz zu anderen Studien, die von einer höheren Wirtssuchaktivität im Herbst berichten, aber im Einklang mit der allgemeinen Annahme eines klaren bimodalen Aktivitätsmusters mit Spitzen im Frühjahr und Herbst, die von einer Phase ohne Aktivität im Sommer unterbrochen werden (BARTOSIK et al. 2012, ZAJAÇ et al. 2021, FÖLDVÁRI et al. 2016, KOHN et al. 2019). Da *D. reticulatus*-Zecken selbst bei Minusgraden noch im November und Februar Wirtssuchaktivität zeigten, scheint eine Aktivität während des gesamten Winters in der Gegend um Leipzig möglich und könnte aufgrund des Klimawandels zunehmen (ZAJAÇ et al. 2021). *D. reticulatus* zeigt in vielen Studien, die mit Flag- oder Schlepptmethoden arbeiten, einen größeren Anteil an Weibchen im Vergleich zu Männchen (THARME 1993, BARTOSIK et al. 2012, BUCZEK et al. 2014, ZAJAÇ et al. 2020a). In der hier vorgestellten Studie konnten ähnliche Beobachtungen mit mehr als doppelt so vielen Weibchen wie Männchen gemacht werden (102 Individuen / 68,9 % Weibchen, 46 Individuen / 31,1 % Männchen). Man nimmt an, dass dies auf die Paarungsstrategie von *D. reticulatus* zurückzuführen ist. Bei dieser müssen die Männchen einen Wirt finden und können über einen längeren Zeitraum auf dem Wirt bleiben, um mehrere Weibchen zu befruchten. Dies wird mit einer höheren Überlebensrate der Weibchen und genetischen Mechanismen (FÖLDVÁRI et al. 2016) sowie einer höheren Entschlossenheit der Weibchen bei der Wirtssuche kombiniert (ZAJAÇ et al. 2020a). Zudem sind *D. reticulatus*-Weibchen resistenter gegenüber Austrocknung (MEYER-KÖNIG et al. 2001). Es konnte in Studien beobachtet werden, dass die Männchen von *D. reticulatus* im Herbst früher mit der Suche beginnen und die Anzahl der Weibchen übertreffen können (THARME 1993). Dieses Phänomen konnte in der dieser Dissertation zugrunde liegenden Studie nicht bestätigt werden. Die Weibchen übertrafen die Männchen in jedem Monat, mit Ausnahme des Monats August, in dem in beiden Jahren die gleiche Anzahl an Tieren gesammelt wurde.

Bezüglich des Einflusses der Tageszeiten zeigten sich bei *I. ricinus* nur vereinzelte signifikante Unterschiede beim Vergleich einzelner Zeitintervalle miteinander und nur bei den Weibchen auf Versuchsfläche WR. Diese Ergebnisse ähneln denen vorangegangener Studien, bei denen ebenfalls nur einzelne signifikante Unterschiede zwischen den Zeitintervallen bei manchen Stadien in manchen Habitaten gefunden werden konnten, jedoch kein klarer, übergreifender Trend erkennbar war (MEJLON 1997). Dies unterstreicht, ebenso wie die Unterschiede zwischen den diurnalen Aktivitätsmustern der verschiedenen Versuchsflächen, die in der dieser Dissertation zugrunde liegenden Studie analysiert wurden, dass die Tagesaktivität offenbar von den örtlichen Bedingungen der Versuchsflächen abhängt und vermutlich schwer zu vergleichen ist. Die Tatsache, dass die Unterschiede in der *I. ricinus*-Aktivität in den verschiedenen Zeitintervallen auf Versuchsfläche AB nicht signifikant waren, obwohl die Zeckenzahl dort am höchsten war, könnte bedeuten, dass die Tageszeit keinen

Einfluss auf das Suchverhalten der Zecken hat und diese Stelle die einzige war, an der es genügend Zecken gab, um Schwankungen auszugleichen. Da sich ein Trend zur höchsten Aktivität bei beiden Geschlechtern und den Nymphen mit der höchsten Aktivität im Intervall von 00:30 – 02:30 zeigte, kann auch eine zu geringe Zeckenzahl die mangelnden Signifikanzen erklären. Eine gesteigerte Aktivität in diesem Zeitintervall könnte damit zusammenhängen, dass Kleinnager wie *Apodemus* spp. und Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*), die auf dieser Versuchsfläche vorkommen und als potenzieller Wirt für Zecken dienen, ebenfalls mitten in der Nacht am aktivsten sind (GREENWOOD 1978). Das Fehlen signifikanter Unterschiede bei der Untersuchung verschiedener Zeitintervalle in einem Wald wurde bereits in früheren Studien beschrieben (MEJLON 1997). In dem in der Studie von MEJLON (1997) untersuchten Wiesenhabitat wurde die höchste Aktivität zwischen 23 Uhr und 3 Uhr morgens festgestellt. In dieser Studie wurden im Lebensraum Wiese / Wegrand (hier repräsentiert durch Standort WR) ähnliche Ergebnisse mit der höchsten Aktivität von *I. ricinus*-Männchen und -Weibchen in der Zeit zwischen 00:30 Uhr und 02:30 Uhr festgestellt. Die höchste Aktivität der Nymphen wurde in der Zeit zwischen 04:30 und 06:30 Uhr und die niedrigste in der Zeit zwischen 00:30 und 02:30 Uhr beobachtet. Diese Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant. Der Unterschied zwischen Wald- und Wiesenhabitat könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zecken im Wiesenhabitat größeren Umwelteinflüssen ausgesetzt sind. Die Aktivitätsunterschiede zwischen den unterschiedenen Zeitintervallen waren jedoch nur in Einzelfällen und auf Versuchsfläche WR für *I. ricinus*-Weibchen signifikant, wovon insgesamt über die eineinhalb Jahre nur 40 Individuen gesammelt werden konnten. Die Relevanz ist darum fraglich.

Bezüglich der Aktivitäten zu verschiedenen Tageszeiten war bei *D. reticulatus* in dieser Studie sowohl im Frühjahr als auch im Herbst eine hohe Aktivität im Intervall von 00:30 Uhr bis 2:30 Uhr zu erkennen, die im Frühjahr jedoch bei den Weibchen im Intervall von 8:30 Uhr bis 10:30 Uhr übertroffen wurde. Dies widerspricht den Ergebnissen einer polnischen Studie, in der erwachsene *D. reticulatus* im Herbst eine erhöhte Aktivität von morgens bis mittags, die um 14 Uhr ihren Höhepunkt erreichte, gefolgt von einem Rückgang und einer insgesamt geringeren Zeckenzahl am Nachmittag zeigten. Im Frühjahr nahm die Zeckenaktivität ebenfalls am Morgen zu, aber die größten Zeckenzahlen wurden am Nachmittag zwischen 14 und 18 Uhr aufgezeichnet (BARTOSIK et al. 2012). Da in der polnischen Studie die Aktivität während der Nachtzeit nicht untersucht wurde, kann hier kein Vergleich gezogen werden. Betrachtet man nur den Tag, so ist im Frühjahr sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen eine höhere Zeckenzahl am Morgen und ein Rückgang am Nachmittag und Abend zu beobachten. Im Herbst ist bei den Männchen eine steigende Aktivität am Morgen mit einem Höhepunkt in der Zeit von 00:30 bis 02:00 zu beobachten, gefolgt von sinkenden Zeckenzahlen. Bei den Weibchen waren im Herbst morgens und mittags identische Zahlen zu verzeichnen, gefolgt von einem Rückgang am Nachmittag. Zusammenfassend scheint die Tageszeit bei Betrachtung über einen längeren Zeitraum von anderthalb Jahren nur einen kleinen Einfluss auf die Aktivität von *D. reticulatus* und *I. ricinus* zu haben, der in dieser Studie nur in Ausnahmefällen signifikant ist. Darum kann sie im Design von Studien zum Vergleich von Zeckenaktivitäten dieser beiden Spezies vermutlich vernachlässigt werden.

In der Betrachtung des Einflusses von Lichtverhältnissen auf die Aktivität von *D. reticulatus* und *I. ricinus* konnten für *I. ricinus* für einige Stadien signifikante Unterschiede mit einer höheren Aktivität in der Dämmerung als in anderen Lichtverhältnissen festgestellt werden, für *D. reticulatus* hingegen waren kaum signifikante Unterschiede festzustellen. Dieser Unterschied erscheint ungewöhnlich, da *D. reticulatus* Augen besitzt, *I. ricinus* jedoch nur fotoempfindliche Zellen und daher weniger in der Lage sein sollte, wechselnde Lichtverhältnisse zu unterscheiden (PERRET 2003, MEHLHORN 2016). Dies könnte damit zusammenhängen, dass einer der Hauptwirte für adulte *D. reticulatus*-Zecken Wildschweine sind, auf deren Anwesenheit auf den Versuchsflächen durch Kotfunde und Wühlspuren geschlossen werden kann. Diese zeigen ein sehr flexibles Aktivitätsmuster mit Wechseln zwischen Aktivität nachts und tagsüber, je nach Bejagung durch den Menschen (OHASHI et al. 2013).

Obwohl die Zeckenzahlen in dieser Studie teils gering waren, kann dennoch eine Aussage über die Aktivität in Verbindung mit den Lichtverhältnissen getroffen werden. Obwohl statistisch nicht signifikant, waren die durchschnittlichen Zeckenzahlen für Adulte und Nymphen von *I. ricinus* während der Dämmerung am höchsten. Studien mit größeren Zeckenzahlen sind erforderlich, um diesen Trend zu bestätigen, aber eine erhöhte Aktivität während der Dämmerung erscheint aufgrund der parallelen Aktivität von Wirtstieren plausibel. Rehe sind beispielsweise während der Dämmerung am aktivsten (HOTHORN et al. 2015, KROP-BENESCH et al. 2013). Auch das Aktivitätsmuster des Feldhasen zeigt Aktivitätsspitzen um Sonnenuntergang und Sonnenaufgang (SCHAI-BRAUN et al. 2012). Rotfüchse sind hauptsächlich dämmerungs- und nachtaktiv, wobei sich ihre Aktivität mit der des Feldhasen am stärksten in der Dämmerung überschneidet (DÍAZ-RUIZ et al. 2016). Daher gewährleistet eine höhere Aktivität von *I. ricinus*-Zecken eine Überschneidung mit der Aktivität des Wirts und eine höhere Wahrscheinlichkeit, dass wirtssuchende Zecken von einem vorbeilaufenden Wirtstier von der Vegetation abgestreift werden. Das Fehlen einer statistischen Signifikanz könnte damit zusammenhängen, dass die AB-Stelle mit der größten Anzahl von *I. ricinus* von einem dichten Baumkronendach bedeckt ist und darum Veränderungen der Lichtintensität nicht derart auf dem Boden ankommen, wie in Habitaten mit direkterer Sonneneinstrahlung. Die beiden anderen Versuchsflächen wiesen jedoch eine relativ geringe Anzahl von *I. ricinus*-Zecken auf, sodass signifikante Ergebnisse schwieriger zu erzielen sind. Die Aktivität von *D. reticulatus* zeigte keine signifikanten Unterschiede bei verschiedenen Lichtverhältnissen. Ihr Wirtssuchverhalten scheint darum unabhängig von den Lichtverhältnissen zu sein und primär durch andere Faktoren beeinflusst zu werden.

Die Aktivität von *I. ricinus*-Nymphen zeigte bei Kombination der Daten aller Versuchsflächen eine Beeinflussung durch Temperatur. Auf Versuchsfläche AB zeigte sich eine Korrelation zwischen der Aktivität von *I. ricinus*-Weibchen und der Temperatur. Für *I. ricinus* ist diese Korrelation, anders als bei *D. reticulatus* wie oben beschrieben, positiv, was bedeutet, dass die Nymphen und Weibchen bei höheren Temperaturen aktiver sind. Diesbezüglich gibt es widersprüchliche Forschungsergebnisse, wenn die Zeckenzahlen mit Temperaturen am Tag des Flaggens korreliert werden sollen. Einerseits liegen Studien vor, nach denen eine Korrelation mit der Temperatur beobachtet werden kann, teils abhängig vom Habitat (Wiese versus Wald) (MEJLON 1997, DANIEL et al. 2015, GETHMANN et al. 2020). Hingegen gibt es andere Studien, die einen

fehlenden Einfluss von Temperatur auf die Aktivität von Nymphen und Adulten von *I. ricinus* nachweisen konnten (GRAY 1984). Diese unterschiedlichen Forschungsergebnisse werden zumeist auf unterschiedliche Umweltbedingungen der erforschten Habitats zurückgeführt.

Die niedrigste Temperatur von 2 °C, bei der in dieser Studie Aktivität von *I. ricinus* nachgewiesen werden konnte, deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen *I. ricinus* ihre Aktivität bei geringen Plusgraden beginnen (HUBÁLEK et al. 2003, SCHULZ et al. 2014).

In dieser Studie konnten *D. reticulatus*-Zecken bei -2 °C und Bodenfrost geflaggt werden, was mit den Ergebnissen anderer Studien übereinstimmt, die *D. reticulatus*-Zecken bei Temperaturen um den Gefrierpunkt und sogar auf gefrorenem Boden fanden (FÖLDVÁRI et al. 2016, HUBÁLEK et al. 2003, NOSEK 1972). Diese Robustheit gegenüber niedrigen Temperaturen ermöglicht *D. reticulatus* Aktivität in milden Wintern (FÖLDVÁRI et al. 2016, BUCZEK et al. 2014). Zudem war es möglich, mehrere *D. reticulatus*-Exemplare bei 33 °C zu flaggen. Dies festigt die Beobachtung, dass *D. reticulatus* sowohl thermophil als auch psychophil ist und in einem breiten Temperaturbereich leben kann (FÖLDVÁRI et al. 2016).

Es konnte in der dieser Dissertation zugrundeliegenden Studie bei *D. reticulatus* zudem eine negative Korrelation zwischen der Wirtssuchaktivität und steigenden Temperaturen festgestellt werden, die mit den Beobachtungen anderer Studien übereinstimmt (BARTOSIK et al. 2012, KOHN et al. 2019). Dies ist jedoch wahrscheinlich eine vereinfachte Darstellung von komplexeren Zusammenhängen, da die Aktivität von *D. reticulatus* bei steigenden Temperaturen zunächst bis zu einem Maximum bei 14 °C ansteigt und erst bei weiter steigenden Temperaturen abfällt (KOHN et al. 2019). Ähnliche Beobachtungen bei *I. ricinus* wurden beschrieben, laut denen die höchsten Aktivitäten bei allen Stadien in einem Temperaturintervall von 10–15 °C festgestellt werden konnte und danach abfielen (DANIEL et al. 2015). Da der Zusammenhang mit der Temperatur nicht den Fokus der hier präsentierten Studie darstellen sollte, sondern nur eine Ergänzung darstellte, wurde auf genauere Analysen zum Temperaturoptimum der beiden Zeckenarten hier verzichtet. Darum kann diesbezüglich keine Aussage zur Vergleichbarkeit getroffen werden.

Die relative Luftfeuchte zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der einzelnen Lebensstadien oder Zeckenarten. Dieser fehlende Einfluss der relativen Luftfeuchte wurde bereits für *D. reticulatus* (BARTOSIK et al. 2011, BUCZEK et al. 2014) sowie für *I. ricinus*, teils spezifisch für bestimmte Habitats (MEJLON 1997), beschrieben (PERRET et al. 2000). Andere Studien beschreiben eine zumeist positive Korrelation (SCHULZ et al. 2014) beziehungsweise eine negative Korrelation zum durchschnittlichen Sättigungsdefizit, das aus der relativen Luftfeuchte und der Temperatur errechnet wird (PERRET et al. 2000). *D. reticulatus* gilt als sehr trocken-tolerante Zeckenart, da ihr Integument eine geringe Transpirationsrate hat und ihr ermöglicht, auch unter sehr trockenen Bedingungen nach Wirten zu suchen (KOHN et al. 2019, MEYER-KÖNIG et al. 2001). Die in der dieser Dissertation zugrundeliegenden Studie lokal im Habitat gemessenen Luftfeuchtigkeiten von 80 % oder weniger stehen in Kontrast zur Literatur, in der berichtet wird, dass Luftfeuchtigkeiten von über 80 % zwingend notwendig seien, um das Überleben von *I. ricinus* zu sichern (STANEK 2005). Dies kann damit erklärt werden, dass die Daten dieser Studie zwar in Bodennähe gemessen

wurden, jedoch nicht direkt in der bodenbedeckenden Vegetation oder Laubstreu, da das verwendete Thermohygrometer für solche Messungen nicht geeignet war. Es konnte in einer anderen Studie bewiesen werden, dass die relative Luftfeuchte direkt in der Laubstreu deutlich höher ist als in der Höhe von 50 Zentimetern über dem Boden. Die in der Studie lokal gemessenen Daten unterscheiden sich ebenfalls noch einmal deutlich von Daten, die von offiziellen Wetterstationen gemessen werden (BOEHNKE et al. 2017). Da es keine kommerziell verfügbaren Sensoren gibt, die für die Messung der relativen Luftfeuchtigkeit in der Laubstreu geeignet sind, erfordern diese Messungen jedoch stets die Konstruktion einer eigenen Messeinheit wie durch BOEHNKE et al. (2017) beschrieben. Diese Methode ist darum nicht in jedem Fall durchführbar und die Messung mit kommerziellen Thermohygrographen in Bodennähe erscheint als passable, wenn auch nicht optimale, Alternative.

In Studien mit statistischer Modellierung der Daten ist beschrieben, dass sich meteorologische Faktoren wie Luftfeuchte, Temperatur und Niederschlag erst mit Zeitverzögerung auf die Aktivität von *I. ricinus* auswirken, was den fehlenden direkten Einfluss der relativen Luftfeuchte in unserer Studie erklären könnte (WONGNAK et al. 2022, JUNG KJÆR et al. 2019, BRUGGER et al. 2017, VOLLACK et al. 2017). Mathematische Vorhersagemodelle, die große Mengen an Daten analysieren können, erscheinen zur Aufklärung der Faktoren, die Zeckenaktivität beeinflussen, gut geeignet und werden vermutlich in der Zukunft zuverlässige Aussagen über zu erwartende Zeckenaktivitäten treffen können. Vermutlich haben die Zusammenhänge aus Makro- und Mikroklima, Vegetation, Verfügbarkeit von Wirten und Lage des analysierten Habitats derart verwobene und komplexe Einflüsse auf die Aktivität von Zecken, dass eine allgemeingültige Vorhersage der Wirtssuchaktivität vermutlich nicht oder nur unter Zuhilfenahme von computergesteuerten Modellen möglich sein wird. Dies wird durch die oben aufgeführten widersprüchlichen Forschungsergebnisse bezüglich des Einflusses von relativer Luftfeuchtigkeit und Temperatur illustriert. Der hier verwendete Ansatz mit Analyse von einzelnen Daten, die beim Zeckenflaggen lokal erhoben werden, erscheint darum nur limitiert aussagekräftig und Trends können vermutlich nicht als allgemeingültig extrapoliert werden. Zudem muss unterschieden werden, dass oben genannte Faktoren sowohl die kurzzeitige Aktivität der Zecken als auch die Zeckenzahlen in einem Gebiet beeinflussen. Es ist aber ausgesprochen schwer, diese beiden Variablen unabhängig voneinander zu analysieren, da über Flaggstudien jeweils nur der aktive Teil der Gesamtzeckenzahl, der auf Wirtssuche ist, quantifiziert werden kann, nicht jedoch der zwar vorhandene, aber nicht aktive Anteil der Population, der sich beispielsweise in der Laubstreu aufhält. Darum kann nicht unterschieden werden, ob ein Habitat von einer größeren Zeckenzahl bewohnt wird als ein anderes, oder ob zum Flagzeitpunkt einfach nur ein größerer Anteil der Gesamtpopulation aktiv auf Wirtssuche ist. Zudem kann nicht beurteilt werden, wie groß der Anteil der Population ist, der durch erfolgreiches Anheften an einen Wirt aus der wirtssuchenden Gruppe entfernt wurde.

Obwohl es zahlreiche Studien über den Einfluss verschiedener ökologischer Faktoren auf das Wirtssuchverhalten von Zecken gibt, sind die genauen Wechselwirkungen immer noch unklar. Des Weiteren werden immer wieder Beobachtungen getätigt, die die bisher als gefestigt angesehenen Auffassungen in Frage stellen. So werden beispielsweise immature Stadien von *D. reticulatus* in einer Vielzahl von Studien als nestassoziiert bezeichnet. Allerdings konnte in der Literaturrecherche keine Studie aufgefunden werden, die

diese Stadien tatsächlich in den Nestern nachweisen konnte. Das heißt die Annahme, dass sie sich in Nagerbauten aufhalten, fußt alleine darauf, dass sie festgesogen auf Nagern, nicht aber in größeren Mengen wirtssuchend auf der Vegetation oder der bodenbedeckenden Laubstreu bei Flagg- oder Drag-Studien aufgefunden werden können. In der hier vorliegenden Studie ist dieser Nachweis mittels der Flaggmethode aber gelungen, was beweist, dass sie sich zumindest unter bestimmten Bedingungen durchaus auf der Vegetation oder auf der Laubstreu aufhalten. Es konnten größere Zahlen von Larven und einzelne Nymphen in zwei verschiedenen Jahren und an zwei verschiedenen Standorten gesammelt werden. In der Literatur wurde bisher nur das Vorkommen einzelner Exemplare auf der Vegetation beschrieben (THARME 1993) oder die Studien verbleiben unklar über die genauen Zahlen, Methoden und Umstände (MARTELLO et al. 2013). Das Zeitfenster, in dem Larven und Nymphen von *D. reticulatus* bisher auf Nagern aufgefunden werden konnten, liegt im Hochsommer und damit genau in der Aktivitätspause der adulten Stadien (NOSEK 1972, THARME 1993, PFÄFFLE et al. 2015). Auch in dieser Studie konnten die Larven und Nymphen in genau diesem Zeitfenster gefunden werden.

Überraschenderweise wurden in der hier vorgestellten Studie die meisten Larven und die einzigen Nymphen am Standort EW geflaggt. Dieser hatte deutlich geringere Zahlen von adulten *D. reticulatus* als der Standort WR. Ein möglicher Grund für diese Diskrepanz könnte die bereits in der Einleitung erwähnte unterschiedliche Wirtspräferenz von adulten und juvenilen Stadien sein. Da Weibchen bis zu 11 Tage an einem Wirt saugen (NOSEK 1972) und Wildschweine in durch den Menschen beeinflussten Ökosystemen Reviere von $4.01 \pm 0.2 \text{ km}^2$ bewohnen (FATTEBERT et al. 2017), könnten die Weibchen beispielsweise an Wildschweinen festgesogen zwischen den Standorten transportiert worden sein. Am Standort EW konnten keine Spuren von Nageraktivität wie beispielsweise Bauten oder Sichtungen der Tiere festgestellt werden. Darum erscheint es möglich, dass die Larven, die sich aus den Eiern der an diesem Standort vom Wirt abgefallenen Weibchen entwickelt haben, keine geeigneten Kleinnager als Wirtstiere auffinden konnten. Dadurch waren sie über längere Zeiträume als in anderen Ökosystemen auf der Oberfläche der Laubschicht aktiv und konnten mittels der Flagg-Methode von dieser abgesammelt werden.

Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen die Wichtigkeit, alle geflaggt Larven mikroskopisch oder molekularbiologisch zu identifizieren. Nur so kann gezeigt werden, dass auch Larven von Spezies, die als nestassoziiert gelten, unter bestimmten Umständen geflaggt werden können. Allerdings sind weitere Untersuchungen nötig, um zu ermitteln, ob das Flaggen von *D. reticulatus* nur ein zufälliges seltenes Ereignis ist, oder ob es zum richtigen Zeitpunkt und an geeigneten Habitaten möglich ist, sie regelmäßig von der Vegetation zu sammeln. Da zahlreiche Studien die Aktivität von *D. reticulatus*-Adulten erforscht haben, aber keine immaturren Stadien finden konnten, erscheint es möglich, dass diese Ereignisse selten und an bestimmte Umstände oder Habitate gebunden sind. Darum könnten systematische Studien zur Suche von juvenilen Stadien von *D. reticulatus* frustrierend sein, das Phänomen bedarf jedoch weiterer Aufklärung. Besonders wichtig ist die Klärung der Frage, wo und wie genau *D. reticulatus*-Larven und -Nymphen auf ihren Wirt treffen, da wie bereits oben erwähnt Berichte über das Flaggen dieser Stadien rar sind, aber auch keine Studien existieren, die die nestassoziierte Lebensweise bestätigen.

Da in einer sächsischen Studie nur wenige Kilometer von den in der hier vorgestellten Studie untersuchten Standorten hohe Prävalenzen von Rickettsien in Adulten und Nymphen von *D. reticulatus* nachgewiesen werden konnten (GALFSKY et al. 2019) und *Rickettsia raoultii* in *D. reticulatus*-Zecken hohe transovariable Übertragungsraten zeigt, erschien der Nachweis von Rickettsien auch in den in dieser Studie untersuchten Individuen wahrscheinlich. Dies hat sich bewahrheitet. Bei einem Nachweis von Rickettsien in Zecken gilt es immer zu bedenken, dass manche Rickettsien-Spezies keine Pathogene sind, sondern eine endosymbiontische Lebensweise in der Zecke aufweisen (PAROLA et al. 2013). Dies konnte in der hier vorgestellten Studie jedoch ausgeschlossen werden, da eine Sequenzierung durchgeführt wurde. Diese bestätigt, dass in der Tat *R. raoultii*, eine pathogene Rickettsienart, nachgewiesen wurde. Der Nachweis von *R. raoultii* in im Feld gesammelten *D. reticulatus*-Larven mit einer hohen minimalen Infektionsrate bestätigt die im Labor nachgewiesene transovariable Übertragung dieser Rickettsien-Spezies in *D. reticulatus*-Zecken (ALBERDI et al. 2012). Da *R. raoultii* in Larven nachgewiesen wurde, die an verschiedenen Versuchsflächen (und innerhalb der Versuchsflächen an verschiedenen Flaggstrecken), zu unterschiedlichen Zeiten und Daten geflaggt worden waren, erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass die Larven von einem einzigen infizierten Weibchen abstammen. In einer in Rumänien durchgeführten Studie wurden durch Sequenzierung des 23S-ribosomalen Gens zwei verschiedene Genotypen von *R. raoultii* gefunden. Sie unterschieden sich durch eine 60 bp-Insertion / Deletion (ANDERSSON et al. 2017). Da in der hier vorgestellten Studie eine andere Methodologie verwendet wurde, ist eine Aussage über das Vorkommen dieser beiden Genotypen im vorliegenden Untersuchungsgebiet nicht möglich.

Die transovariable Übertragung von *Babesia canis* in *D. reticulatus* wurde in Laborversuchen nachgewiesen (MIERZEJEWSKA et al. 2018). Sowohl in der aktuellen Studie als auch in früheren Untersuchungen, die in der Nähe der hier untersuchten Gebiete durchgeführt wurden, konnte *Babesia* spp. in juvenilen Stadien von *D. reticulatus* (ungesogen und an Nagetieren angeheftet) nicht nachgewiesen werden; sie wurden bisher nur in adulten *D. reticulatus* mit einer eher geringen Prävalenz von 3,8 % gefunden (OBIEGALA et al. 2015, GALFSKY et al. 2019). Dies steht im Einklang mit Ergebnissen aus östlichen Gebieten Polens, wo *Babesia* spp. ebenfalls mit einer niedrigen Prävalenz (2,7 %) bei wirtssuchenden, adulten *D. reticulatus* nachgewiesen wurden (WÓJCIK-FATLA et al. 2015).

Bartonellen und *Neoehrlichia mikurensis* konnte in der dieser Dissertation zugrunde liegenden Studie nicht in den juvenilen Zeckenstadien von *D. reticulatus* nachgewiesen werden. In einer vorangegangenen Studie in ähnlichen Gebieten im Leipziger Süden zeigten sich für *Bartonella* spp. in gesogenen juvenilen *D. reticulatus* Prävalenzen von 40 (Larven) bzw. 35,3% (Nymphen). *Neoehrlichia mikurensis* konnte in gesogenen Larven nicht nachgewiesen werden, in gesogenen Nymphen mit einer Prävalenz von 9,8%. In wirtssuchenden Adulten konnten beide Pathogene jedoch nicht nachgewiesen werden (GALFSKY et al. 2019). Es erscheint darum möglich, dass diese beiden Erreger bei einer Blutmahlzeit von *D. reticulatus* vorübergehend aufgenommen werden, es jedoch nicht zu einer dauerhaften Infektion kommt. Diese Hypothese wird zumindest für *Bartonella* spp. von einer Studie durch DWUZNİK et al. (2019) untermauert. Dies steht im Einklang mit anderen Studien, die diese Erreger in wirtssuchenden adulten *D. reticulatus* nicht nachweisen konnten (RICHTER et al. 2012,

GROCHOWSKA et al. 2022). Soweit aus der Literaturrecherche ersichtlich, wurden Prävalenzen von zeckenübertragenen Pathogenen in ungesogenen juvenilen *D. reticulatus* noch nie in einer vorangegangenen wissenschaftlichen Studie untersucht.

6. Zusammenfassung

Hannah Schmuck

Studien zum Einfluss ausgewählter ökologischer Faktoren auf das Wirtssuchverhalten der Zeckenarten *Ixodes ricinus* und *Dermacentor reticulatus* sowie zur Prävalenz verschiedener zeckenübertragener Pathogene in subadulten Stadien von *Dermacentor reticulatus*

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im Mai 2023

41 Seiten, 12 Abbildungen, 14 Tabellen, 155 Literaturangaben, 2 Anhänge

Schlüsselwörter: *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, juvenile Stadien, *Rickettsia raoultii*, *Babesia* spp., *Neoehrlichia mikurensis*, *Bartonella* spp.

Einleitung: Zecken sind wichtige Überträger von Pathogenen auf Menschen und Tiere und spielen eine essenzielle Rolle im Infektionsgeschehen verschiedener Zoonosen. Um diese Infektionszyklen zu verstehen, ist es wichtig, das Wirtssuchverhalten der in Deutschland häufigsten Zeckenarten *Ixodes ricinus* und *Dermacentor reticulatus* und die Einflüsse von Umweltbedingungen darauf zu kennen. Bei *D. reticulatus* existieren zwar Studien zum Verhalten und zu Prävalenzen von Pathogenen in erwachsenen oder gesogenen juvenilen Stadien, jedoch ist das Wissen über wirtssuchende juvenile Stadien sehr begrenzt.

Ziele dieser Studie waren: (i) Den Einfluss von Temperatur, relativer Luftfeuchte, Tageszeit und Lichtverhältnissen auf die Wirtssuchaktivität von *I. ricinus* und *D. reticulatus* zu untersuchen; (ii) Zu ergründen, ob juvenile Stadien von *D. reticulatus* durch die Flaggmethode gesammelt werden können und (iii) diese juvenilen Stadien auf das Vorhandensein von *Rickettsia raoultii*, *Babesia* spp., *Neoehrlichia mikurensis* und *Bartonella* spp. zu testen.

Tiere, Material und Methoden: An drei verschiedenen Standorten (Am Bach „AB“, Eichenwald „EW“ und Wegrand „WR“) im Süden Leipzigs wurden einmal monatlich zu sechs verschiedenen Uhrzeiten mittels Flaggmethode Zecken von der Vegetation abgesammelt. Die Temperatur und relative Luftfeuchte wenige Zentimeter über dem Boden an der Versuchsfläche sowie die Uhrzeit und die Lichtverhältnisse des jeweiligen Versuchsintervalles wurden aufgezeichnet. Die Stadien und Geschlechter der Zecken wurden mikroskopisch mittels morphologischer Merkmale ermittelt. DNA wurde aus den juvenilen Stadien von *D. reticulatus* extrahiert und sowohl auf das Vorhandensein der oben genannten Pathogene untersucht als auch genetisch auf die Zugehörigkeit zur Spezies *D. reticulatus* überprüft. Die Larven wurden zur molekularbiologischen Analyse gepoolt, die Erregerprävalenz in ihnen ist darum als minimale Infektionsrate angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mit IBM® SPSS Statistics 25. Die Vergleiche der Anzahl der Zecken pro 100 m² erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test. Wenn dieser signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) ergab, folgte ein direkter paarweiser Vergleich. Die Signifikanz wird nach der Bonferroni-Korrektur angegeben. Zur Analyse des

Einfluss von Temperatur und Luftfeuchtigkeit auf die Zeckenaktivität wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient verwendet.

Ergebnisse: Insgesamt wurden 1.815 Zecken in 16 Monaten von der bodenbedeckenden Schicht gesammelt. Davon waren bei *I. ricinus* 144 Individuen weiblich, 135 männlich, 1107 Nymphen und 232 Larven. *D. reticulatus* schlüsselte sich in 102 Weibchen, 46 Männchen, 2 Nymphen und 47 Larven auf. Die Aktivität zu verschiedenen Zeitintervallen zeigte nur in Einzelfällen signifikante Unterschiede. Bei Vergleich der Aktivität zu verschiedenen Lichtverhältnissen (hell, dunkel, dämmerig) zeigen sich bei *D. reticulatus* keine signifikanten Unterschiede. Bei *I. ricinus* lagen teils signifikante Unterschiede bei verschiedenen Stadien und Lichtverhältnissen vor, ein klares Muster war jedoch nicht erkennbar. Beim Vergleich der durchschnittlichen Zahlen von *I. ricinus* zu den verschiedenen Lichtverhältnissen jedoch zeigt sich ein Trend zu höherer Aktivität von allen Stadien von *I. ricinus* während der Dämmerung. Eine positive Korrelation zwischen Temperatur und Anzahl von *I. ricinus*-Nymphen sowie eine negative Korrelation zwischen Temperatur und Anzahl von *D. reticulatus* wurde festgestellt. Es bestand keine Korrelation zwischen Zeckenzahlen und relativer Luftfeuchtigkeit. Die oben erwähnten juvenilen Stadien von *D. reticulatus* konnten im Juni 2018 sowie Juni und Juli 2019 an den Standorten EW und WR (Larven) sowie einmalig im Juli 2019 (Nymphen) auf Versuchsfläche EW mittels Flaggmethode gesammelt werden. Die morphologische Identifikation als juvenile Stadien von *D. reticulatus* konnte eindeutig mittels PCR bestätigt werden. In der Untersuchung auf Pathogene lag eine Mindestinfektionsrate der Larven von 42,2 % mit *Rickettsia raoultii* vor; nur eine der Nymphen wurde untersucht und war ebenfalls positiv. Die anderen untersuchten Erreger konnten nicht nachgewiesen werden.

Schlussfolgerungen: Die Tageszeit scheint für die Aktivität von *I. ricinus* und *D. reticulatus* nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Lichtverhältnisse scheinen jedoch zumindest bei *I. ricinus* einen gewissen Einfluss zu haben, insbesondere hinsichtlich einer erhöhten Aktivität in der Dämmerung. Hier sollten weitere Studien mit größeren Zeckenzahlen folgen, um mehr signifikante Ergebnisse zu erlangen. Die relative Luftfeuchte beeinflusste die Aktivität der Zecken nicht, ein Einfluss der Temperatur besteht jedoch. Es konnte zudem bewiesen werden, dass im richtigen Zeitfenster tatsächlich juvenilen Stadien von *D. reticulatus* in der Vegetation oder auf dem Untergrund gesammelt werden können. Weitere Untersuchungen müssen jedoch zeigen, ob das Sammeln der Jungtiere von *D. reticulatus* mittels Flaggmethode an bestimmte Witterungsbedingungen oder an ein kleines Zeitfenster der Aktivität dieser Lebensstadien gebunden ist, oder ob das Auftreten dieser Stadien mit dem Habitat und spezifischen ökologischen Bedingungen zusammenhängt. Diese Informationen sind nicht nur wichtig für das Wissen über die Ökologie von *D. reticulatus*, sondern auch für ein besseres Verständnis der Infektionszyklen von zeckenübertragenen Krankheiten. Der Nachweis von *Rickettsia raoultii* in mittels Flaggmethode gesammelten *D. reticulatus*-Larven deutet darauf hin, dass die transovariable Übertragung ein effizienter Weg und möglicherweise sogar essenziell zur Aufrechterhaltung des Infektionszyklus dieses Erregers sein könnte.

7. Summary

Hannah Schmuck

Studies on the influence of selected ecological factors on the host-seeking behavior of the tick species *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* and on the prevalence of various tick-borne pathogens in subadult stages of *Dermacentor reticulatus*

Institute of Animal Hygiene and Public Veterinary Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in May 2023

41 pages, 12 figures, 14 tables, 155 references, 2 appendices

Keywords: *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, juvenile stages, *Rickettsia raoultii*, *Babesia spp.*, *Neoehrlichia mikurensis*, *Bartonella spp.*

Introduction: Ticks are important vectors of pathogens for humans and animals and play an essential role in the infection cycle of several zoonotic diseases. To understand these infection cycles, it is important to know the host-seeking behavior of the most common tick species in Germany, *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*, and the influence of environmental conditions on them. For *D. reticulatus*, studies on behavior and prevalences of pathogens in adult or engorged juvenile stages exist, but knowledge on host-seeking juvenile stages is very limited.

The objectives of this study were: (i) To investigate the influence of temperature, relative humidity, time of day, and light conditions on host-seeking activity of *I. ricinus* and *D. reticulatus*; (ii) To determine if juvenile stages of *D. reticulatus* can be collected by the flagging method; and (iii) To test these juvenile stages for the presence of *Rickettsia raoultii*, *Babesia spp.*, *Neoehrlichia mikurensis*, and *Bartonella spp.*

Animals, material and methods: Ticks were collected from vegetation at three different sites (riparian forest “AB”, oak plantation “EW” and wayside “WR”) in the south of Leipzig once a month at six different times using the flag method. The temperature and relative humidity a few centimeters above the ground at the experimental site as well as the time and light conditions of each flagging interval were recorded. The stages and sex of the ticks were determined microscopically using morphological keys. DNA was extracted from the juvenile stages of *D. reticulatus* and examined for the presence of the above-mentioned pathogens as well as genetically tested to verify that they are indeed *D. reticulatus* ticks. The larvae were pooled for molecular biological analysis, and the pathogen prevalence in them is therefore expressed as the minimal infection rate. Statistical analysis was performed using IBM® SPSS Statistics 25, and comparisons of the number of ticks per 100 m² were made using the Kruskal-Wallis test; if this revealed significant differences, a direct pairwise comparison followed. Significance is indicated after Bonferroni correction. Pearson’s correlation coefficient was used to analyse the effect of temperature and humidity on tick activity.

Results: A total of 1,815 ticks were collected from the ground-covering layer over 16 months. The group of *I. ricinus* consisted of 144 females, 135 males, 1107 nymphs, and 232 larvae. The group of *D. reticulatus* consisted of 102 females, 46 males, 2 nymphs, and 47 larvae. Activity at different time intervals showed significant differences only in isolated cases. Comparison of activity at different light conditions (light, dark, twilight) showed no significant differences for *D. reticulatus*. For *I. ricinus*, significant differences were present in some cases at different stages and light conditions, but a clear pattern was not evident. However, when comparing the average numbers of *I. ricinus* at the different light conditions, a trend toward higher activity from all stages of *I. ricinus* during twilight was evident. A positive correlation between temperature and numbers of *I. ricinus* nymphs and a negative correlation between temperature and numbers of *D. reticulatus* were observed. There was no correlation between tick numbers and relative humidity. The above-mentioned juvenile stages of *D. reticulatus* could be collected in June 2018 and June and July 2019 at sites EW and WR (larvae) and once in July 2019 (nymphs) at site EW via flagging method. Morphological identification as juvenile stages of *D. reticulatus* could be clearly confirmed by PCR. In the examination for pathogens, a minimum infection rate of larvae of 42.2 % with *Rickettsia raoultii* was found; only one of the nymphs was examined and also showed positive results. The other examined pathogens could not be detected.

Conclusions: Time of day appears to play only a minor role in the activity of *I. ricinus* and *D. reticulatus*. However, light conditions seem to have some influence, at least for *I. ricinus*, especially with regard to increased activity during twilight. Further studies with larger numbers of ticks should follow to obtain more significant results. Relative humidity did not influence the activity of the ticks, but there is an influence of temperature. It was also proven that in the right time window juvenile stages of *D. reticulatus* can indeed be collected in vegetation or on the substrate. However, further research is needed to determine whether the collection of *D. reticulatus* juveniles via flagging is tied to specific weather conditions or to a small window of activity of these life stages, or whether the occurrence of these stages is related to habitat and specific ecological conditions. This information is important not only to obtain more information about the ecology of *D. reticulatus*, but also for a better understanding of infection cycles of tick-borne diseases. The detection of *Rickettsia raoultii* in *D. reticulatus* larvae collected by the flagging method suggests that transovarial transmission may be an efficient pathway and possibly even essential for maintaining the infection cycle of this pathogen.

8. Literaturverzeichnis

- Akimov I, Nebogatkin I. Distribution of ticks from of the genus *Dermacentor* (Acari, Ixodidae) in Ukraine. *Vestnik zoologii*. 2011; 45(1):e-1-e-6.
- Alberdi MP, Nijhof AM, Jongejan F, Bell-Sakyi L. Tick cell culture isolation and growth of *Rickettsia raoultii* from Dutch *Dermacentor reticulatus* ticks. *Ticks Tick-borne Dis*. 2012; 3(5-6):349–54. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.10.020.
- Andersson M, Bartkova S, Lindestad O, Råberg L. Co-Infection with ‘*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*’ and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* Ticks in Southern Sweden. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2013; 13(7):438–42. doi: 10.1089/vbz.2012.1118.
- Andersson MO, Tolf C, Tamba P, Stefanache M, Radbea G, Frangoulidis D, et al. Molecular survey of neglected bacterial pathogens reveals an abundant diversity of species and genotypes in ticks collected from animal hosts across Romania. *Parasites Vectors*. 2018; 11(1):144. doi: 10.1186/s13071-018-2756-1.
- Andersson MO, Tolf C, Tamba P, Stefanache M, Radbea G, Rubel F, et al. *Babesia*, *Theileria*, and *Hepatozoon* species in ticks infesting animal hosts in Romania. *Parasitol Res*. 2017; 116(8):2291–7. doi: 10.1007/s00436-017-5537-4.
- Apanaskevich DA, Oliver Jr JH. Life cycles and natural history of ticks. In: Sonenshine DE and Roe RM, Hrsg. *Biology of ticks*. 2. Aufl. New York: Oxford University Press; 2014. p. 59–73.
- Azagi T, Hoornstra D, Kremer K, Hovius JWR, Sprong H. Evaluation of disease causality of rare *Ixodes ricinus*-borne infections in Europe. *Pathogens*. 2020; 9(2):150. doi: 10.3390/pathogens9020150
- Barker SC, Murrell A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*. 2004; 129 Suppl:S15-36. doi: 10.1017/S0031182004005207.
- Bartosik K, Wiśniowski Ł, Buczek A. Abundance and seasonal activity of adult *Dermacentor reticulatus* (Acari: Amblyommidae) in eastern Poland in relation to meteorological conditions and the photoperiod. *Ann Agric Environ Med*. 2011; 18(2):340-344.
- Bartosik K, Wiśniowski Ł, Buczek A. Questing Behavior of *Dermacentor reticulatus* Adults (Acari: Amblyommidae) During Diurnal Activity Periods in Eastern Poland. *J Med Entomol*. 2012; 49(4):859–64.
- Belozеров VN. Diapause and Biological Rhythms in Ticks. In: Obenchain FD, Galun R Hrsg. *Physiology of Ticks*. 1. Aufl. Oxford: Pergamon Press; 1982. p. 469–500.
- Billeter SA, Levy MG, Chomel BB, Breitschwerdt EB. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med Vet Entomol*. 2008; 22(1):1–15. doi: 10.1111/j.1365-2915.2008.00713.x.
- Boehnke D, Gebhardt R, Petney TN, Norra S. On the complexity of measuring forests microclimate and interpreting its relevance in habitat ecology: the example of *Ixodes ricinus* ticks. *Parasites Vectors*. 2017; 10(1):549. doi: 10.1186/s13071-017-2498-5.
- Bown KJ, Bennet M, Begon M. Flea-borne *Bartonella grahamii* and *Bartonella taylorii* in bank voles. *Emerging Infect Dis*. 2004; 10(4):684–7. doi: 10.3201/eid1004.030455.
- Brugger K, Boehnke D, Petney TN, Dobler G, Pfeffer M, Silaghi C et al. A Density Map of the Tick-Borne Encephalitis and Lyme Borreliosis Vector *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) for Germany. *J Med Entomol*. 2016; 53(6):1292–302. doi: 10.1093/jme/tjw116.
- Brugger K, Walter M, Chitimia-Dobler L, Dobler G, Rubel F. Seasonal cycles of the TBE and Lyme borreliosis vector *Ixodes ricinus* modelled with time-lagged and interval-averaged predictors. *Exp Appl Acarol*. 2017; 73: 439-450. doi: 10.1007/s10493-017-0197-8.
- Brugger K, Walter M, Chitimia-Dobler L, Dobler G, Rubel F. Forecasting next season’s *Ixodes ricinus* nymphal density: the example of southern Germany 2018. *Exp Appl Acarol*. 2018; 75:281-288. doi: 10.1007/s10493-018-0267-6.
- Buchwald A. Ein Fall von diffuser idiopathischer Haut-Atrophie. *Vierteljahresschrift für Dermatologie und Syphilis*. 1883; 10(1):553–6. doi: 10.1007/BF01833474.

- Buczek A, Bartosik K, Zajac Z. Changes in the activity of adult stages of *Dermacentor reticulatus* (Ixodida: Amblyomidae) induced by weather factors in eastern Poland. *Parasites Vectors*. 2014; 7(1):245. doi: 10.1186/1756-3305-7-245.
- Casati S, Sager H, Gern L, Piffaretti J. Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Ann Agric Environ Med*. 2006; 13(1):65.
- Chitimia-Dobler L. Spatial distribution of *Dermacentor reticulatus* in Romania. *Vet Parasitol*. 2015; 214(1):219–23. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.09.018.
- Chitimia-Dobler L, Araujo BC de, Ruthensteiner B, Pfeffer T, Dunlop JA. *Amblyomma birmitum* a new species of hard tick in Burmese amber. *Parasitology*. 2017; 144(11):1441–8. doi: 10.1017/S0031182017000853.
- Cotté V, Bonnet S, Le Rhun D, Le Naour E, Chauvin A, Boulouis H-J et al. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerging Infect Dis*. 2008; 14(7):1074–80. doi: 10.3201/eid1407.071110.
- Daniel M, Danielová V, Kříž B, Kott I. An attempt to elucidate the increased incidence of tick-borne encephalitis and its spread to higher altitudes in the Czech Republic. *Int J Med Microbiol Suppl*. 2004; 293:55–62. doi: 10.1016/S1433-1128(04)80009-3.
- Daniel M, Malý M, Danielová V, Kříž B, Nuttall P. Abiotic predictors and annual seasonal dynamics of *Ixodes ricinus*, the major disease vector of Central Europe. *Parasites Vectors*. 2015; 8(1):478. doi: 10.1186/s13071-015-1092-y.
- Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol*. 2012; 28(10):437–46. doi: 10.1016/j.pt.2012.07.003.
- Dautel H. Zecken und Temperatur. In: Aspöck H Hrsg. Krank durch Arthropoden. *Denisia* 30: 2010. p. 149–170.
- Dautel H, Dippel C, Kämmer D, Werkhausen A, Kahl O. Winter activity of *Ixodes ricinus* in a Berlin forest. *Int J Med Microbiol*. 2008; 298:50–4. doi: 10.1016/j.ijmm.2008.01.010.
- Deplazes P, Joachim A, Mathis A, Strube C, Taubert A, von Samson-Himmelstjerna G, Zahner H. *Parasitologie für die Tiermedizin*. 4. Aufl. Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag; 2021.
- Díaz-Ruiz F, Caro J, Delibes-Mateos M, Arroyo B, Ferreras P. Drivers of red fox (*Vulpes vulpes*) daily activity: prey availability, human disturbance or habitat structure? *J Zool*. 2016; 298(2):128–38. doi: 10.1111/jzo.12294.
- Dietrich F, Schmidgen T, Maggi RG, Richter D, Matuschka F-R, Vonthein R et al. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76(5):1395–8. doi: 10.1128/AEM.02788-09.
- Dwużnik D, Mierzejewska EJ, Drabik P, Kloch A, Alsarraf M, Behnke JM, Bajer A. The role of juvenile *Dermacentor reticulatus* ticks as vectors of microorganisms and the problem of ‘meal contamination’. *Exp Appl Acarol*. 2019; 78:181–202. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00380-6>
- Estrada-Peña A. Understanding the Relationships between Landscape Connectivity and Abundance of *Ixodes ricinus* Ticks. *Exp Appl Acarol*. 2002; 28(1):239–48. doi: 10.1023/A:1025362903620.
- Estrada-Peña A, Mihalca AD, Petney TN. *Ticks of Europe and North Africa: A Guide to Species Identification*. Cham: Springer; 2018.
- Fattebert J, Baubet E, Slotow R, Fischer C. Landscape effects on wild boar home range size under contrasting harvest regimes in a human-dominated agro-ecosystem. *Eur J Wildl Res*. 2017; 63(2):1–9. doi: 10.1007/s10344-017-1090-9.
- Filippova NA. [Ixodid ticks of subfamily Amblyomminae. In: Filippova NA, Hrsg. *Fauna of Russia and neighbouring countries*]. St Petersburg: Nauka; 1997. Russisch.
- Foissac M, Socolovschi C, Raoult D. Les nouveautés sur le syndrome SENLAT: Scalp Eschar and Neck Lymphadenopathy after Tick bite. In: *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*: Elsevier. p. 598–609. doi: 10.1016/j.annder.2013.07.014. Französisch.

- Földvári G, Rigó K, Lakos A. Transmission of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia raoultii* by male *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks to humans. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 76(3):387–9.
- Földvári G, Siroký P, Szekeres S, Majoros G, Sprong H. *Dermacentor reticulatus*: A vector on the rise. *Parasites Vectors*. 2016; 9(1):1-29. doi: 10.1186/s13071-016-1599-x.
- Galfsky D, Król N, Pfeiffer M, Obiegala A. Long-term trends of tick-borne pathogens in regard to small mammal and tick populations from Saxony, Germany. *Parasites Vectors*. 2019; 12(1):131. doi: 10.1186/s13071-019-3382-2.
- Gethmann J, Hoffmann B, Kasbohm E, Süß J, Habedank B, Conraths FJ et al. Research paper on abiotic factors and their influence on *Ixodes ricinus* activity—observations over a two-year period at several tick collection sites in Germany. *Parasitol Res*. 2020; 119:1455-66. doi: 10.1007/s00436-020-06666-8.
- Gray JS, Kahl O, Zintl A. What do we still need to know about *Ixodes ricinus*? *Ticks Tick Borne Dis*. 2021; 12(3):101682. doi: 10.1016/j.ttbdis.2021.101682.
- Gray JS. Studies on the dynamics of active populations of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. in Co. Wicklow, Ireland. *Acarologia*. 1984; 25(2):167–78.
- Gray JS, Estrada-Peña A, Zintl A. Vectors of Babesiosis. *Annu Rev Entomol*. 2019; 64(1):149–65. doi: 10.1146/annurev-ento-011118-111932.
- Greenwood PJ. Timing of Activity of the Bank Vole *Clethrionomys Glareolus* and the Wood Mouse *Apodemus Sylvaticus* in a Deciduous Woodland. *Oikos*. 1978; 31(1):123–7. doi: 10.2307/3543393.
- Grochowska A, Milewski R, Pancewicz S, Dunaj J, Czupryna P, Milewska AJ et al. Comparison of tick-borne pathogen prevalence in *Ixodes ricinus* ticks collected in urban areas of Europe. *Sci Rep*. 2020; 10(1):6975. doi: 10.1038/s41598-020-63883-y.
- Grochowska A, Dunaj-Małyszko J, Pancewicz S, Czupryna P, Milewski R, Majewski P, et al. Prevalence of Tick-Borne Pathogens in Questing *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* Ticks Collected from Recreational Areas in Northeastern Poland with Analysis of Environmental Factors. *Pathogens*. 2022; 11:468. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040468>
- Halos L, Jamal T, Maillard R, Beugnet F, Le Menach A, Boulouis H-J et al. Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* sp. *Vet Res*. 2005; 36(1):79–87. doi: 10.1051/vetres:2004052.
- Halos L, Jamal T, Maillard R, Girard B, Guillot J, Chomel B et al. Role of Hippoboscidae Flies as Potential Vectors of *Bartonella* spp. Infecting Wild and Domestic Ruminants. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70(10):6302. doi: 10.1128/AEM.70.10.6302-6305.2004.
- Häselbarth K, Tenter AM, Brade V, Krieger G, Hunfeld K-P. First case of human babesiosis in Germany – Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. *Int J Med Microbiol*. 2007; 297(3):197–204. doi: 10.1016/j.ijmm.2007.01.002.
- Hasle G, Leinaas HP, Røed KH, Øines Ø. Transport of *Babesia venatorum*-infected *Ixodes ricinus* to Norway by northward migrating passerine birds. *Acta Vet Scand*. 2011; 53(1):41. doi: 10.1186/1751-0147-53-41.
- Herrmann C, Gern L. Survival of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) under challenging conditions of temperature and humidity is influenced by *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection. *J Med Entomol*. 2010; 47(6):1196–204. doi: 10.1603/me10111.
- Heylen D, Coninck E de, Jansen F, Madder M. Differential diagnosis of three common *Ixodes* spp. ticks infesting songbirds of Western Europe: *Ixodes arboricola*, *I. frontalis* and *I. ricinus*. *Ticks Tick Borne Dis*. 2014; 5(6):693–700. doi: 10.1016/j.ttbdis.2014.05.006.
- Honig V, Carolan HE, Vavruskova Z, Massire C, Mosel MR, Crowder CD et al. Broad-range survey of vector-borne pathogens and tick host identification of *Ixodes ricinus* from Southern Czech Republic. *FEMS Microbiol Ecol*. 2017; 93(11). doi: 10.1093/femsec/fix129.
- Hönig V, Svec P, Halas P, Vavruskova Z, Tykalova H, Kilian P et al. Ticks and tick-borne pathogens in South Bohemia (Czech Republic)-Spatial variability in *Ixodes ricinus* abundance, *Borrelia burgdorferi* and tick-

- borne encephalitis virus prevalence. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015; 6(5):559–67. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.04.010.
- Hornok S, Fuente J, Horváth G, Fernández de Mera I, Wijnveld M, Táncoz B et al. Molecular evidence of *Ehrlichia canis* and *Rickettsia massiliae* in ixodid ticks of carnivores from South Hungary. *Acta Vet Hung.* 2012; 61(1):42–50. doi: 10.1556/avet.2012.050
- Hothorn T, Müller J, Held L, Möst L, Myrsterud A. Temporal patterns of deer–vehicle collisions consistent with deer activity pattern and density increase but not general accident risk. *Accid Anal Prev.* 2015; 81:143–52. doi: 10.1016/j.aap.2015.04.037.
- Hubálek Z, Halouzka J, Juricova Z. Host-seeking activity of ixodid ticks in relation to weather variables. *J Vector Ecol.* 2003; 28:159–65.
- Hunfeld K-P, Lambert A, Kampen H, Albert S, Epe C, Brade V et al. Seroprevalence of *Babesia* Infections in Humans Exposed to Ticks in Midwestern Germany. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(7):2431–6. doi: 10.1128/JCM.40.7.2431-2436.2002.
- Jahfari S, Fonville M, Hengeveld P, Reusken C, Scholte E-J, Takken W et al. Prevalence of *Neoehrlichia mikurensis* in ticks and rodents from North-west Europe. *Parasites Vectors.* 2012; 5(1):74. doi: 10.1186/1756-3305-5-74.
- Jalovecka M, Sojka D, Ascencio M, Schnittger L. *Babesia* Life Cycle - When Phylogeny Meets Biology. *Trends Parasitol.* 2019; 35(5): 356–68. doi: 10.1016/j.pt.2019.01.007
- Jensen PM, Kaufmann U, Smirnova L. Diurnal activity of *Ixodes ricinus* in Denmark: aspects of physiological age and genotypic variation. *Hereditas.* 1999; 130(3):325–30. doi: 10.1111/j.1601-5223.1999.00325.x.
- Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology.* 2004; 129 Suppl:S3-14. doi: 10.1017/s0031182004005967.
- Jonsson N, Mayer D, Matschoss A, Green P, Ansell J. Production effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation of high yielding dairy cows. *Vet Parasitol.* 1998; 78(1):65–77. doi: 10.1016/S0304-4017(98)00118-6.
- Jonsson NN, Davis R, Witt M de. An estimate of the economic effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on Queensland dairy farms. *Aust Vet J.* 2001; 79(12):826–31. doi: 10.1111/j.1751-0813.2001.tb10929.x.
- Jung Kjær L, Soleng A, Edgar KS, Lindstedt HEH, Paulsen KM, Andreassen ÅK et al. Predicting the spatial abundance of *Ixodes ricinus* ticks in southern Scandinavia using environmental and climatic data. *Sci Rep.* 2019; 9(1):18144. doi: 10.1038/s41598-019-54496-1.
- Kahl O, Gray JS. The biology of *Ixodes ricinus* with emphasis on its ecology. *Ticks Tick Borne Dis.* 2022:102114. doi: 10.1016/j.ttbdis.2022.102114.
- Karlsson ME, Andersson MO. *Babesia* species in questing *Ixodes ricinus*, Sweden. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016; 7(1):10–2. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.07.016.
- Kohn M, Krücken J, McKay-Demeler J, Pachnicke S, Krieger K, Samson-Himmelstjerna G von. *Dermacentor reticulatus* in Berlin/Brandenburg (Germany): Activity patterns and associated pathogens. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019; 10(1):191–206. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.10.003.
- Król N, Militzer N, Stöbe E, Nijhof AM, Pfeffer M, Kempf VAJ et al. Evaluating Transmission Paths for Three Different *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* Ticks Using Artificial Feeding. *Microorganisms.* 2021; 9(5). doi: 10.3390/microorganisms9050901.
- Krop-Benesch A, Berger A, Hofer H, Heurich M. Long-term measurement of roe deer (*Capreolus capreolus*) (Mammalia: Cervidae) activity using two-axis accelerometers in GPS-collars. *Ital J Zool.* 2013; 80(1):69–81. doi: 10.1080/11250003.2012.725777.
- Krügel M, Król N, Kempf VAJ, Pfeffer M, Obiegala A. Emerging rodent-associated *Bartonella*: a threat for human health? *Parasites Vectors.* 2022; 15(1):113. doi: 10.1186/s13071-022-05162-5.
- Krügel M, Pfeffer M, Król N, Imholt C, Baert K, Ulrich RG et al. Rats as potential reservoirs for neglected zoonotic *Bartonella* species in Flanders, Belgium. *Parasites Vectors.* 2020; 13(1):235. doi: 10.1186/s13071-020-04098-y.

- Labbé Sandelin L, Olofsson J, Tolf C, Rohlén L, Brudin L, Tjernberg I et al. Detection of *Neoehrlichia mikurensis* DNA in blood donors in southeastern Sweden. *Infect Dis (Lond)*. 2022; 54(10):748–59. doi: 10.1080/23744235.2022.2087732.
- Lees AD. The water balance in *Ixodes ricinus* L. and certain other species of ticks. *Parasitology*. 1946; 37(1-2):1–20. doi: 10.1017/S0031182000013093.
- Lees AD, Milne A. The seasonal and diurnal activities of individual sheep ticks (*Ixodes ricinus* L.). *Parasitology*. 1951; 41(3-4):189–208. doi: 10.1017/S0031182000084031.
- Lei BR, Olival KJ. Contrasting patterns in mammal-bacteria coevolution: *Bartonella* and *Leptospira* in bats and rodents. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(3):e2738. doi: 10.1371/journal.pntd.0002738.
- Leschnik M, Kirtz G, Tichy A, Leidinger E. Seasonal occurrence of canine babesiosis is influenced by local climate conditions. *Int J Med Microbiol*. 2008; 298:243–8. doi: 10.1016/j.ijmm.2008.03.008.
- Ličková M, Fumačová Havlíková S, Sláviková M, Slovák M, Drexler JF, Klempa B. *Dermacentor reticulatus* is a vector of tick-borne encephalitis virus. *Ticks Tick Borne Dis*. 2020; 101414. doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101414.
- Loewenich FD von, Geissdörfer W, Disqué C, Matten J, Schett G, Sakka SG et al. Detection of „*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*“ in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(7):2630–5. doi: 10.1128/JCM.00588-10.
- Macaluso KR, Sonenshine DE, Ceraul SM, Azad AF. Infection and Transovarial Transmission of Rickettsiae in *Dermacentor variabilis* Ticks Acquired by Artificial Feeding. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2001; 1(1):45–53. doi: 10.1089/153036601750137660.
- Madden SC, Madden RC. Seasonality in diurnal locomotory patterns of adult blacklegged ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*. 2005; 42(4):582–8.
- Maggi RG, Diniz PP, Cadenas MB, Breitschwerdt EB. The use of molecular diagnostic techniques to detect *Anaplasma*, *Bartonella* and *Ehrlichia* species in arthropods or patients. In: The international canine vector-borne disease symposium. Alcester, UK: Billesley, 2006. p. 8–13.
- Mangold AJ, Bargues MD, Mas-Coma S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res*. 1998; 84(6):478–84. doi: 10.1007/s004360050433.
- Mans BJ, Louw AI, Neitz AWH. Evolution of Hematophagy in Ticks: Common Origins for Blood Coagulation and Platelet Aggregation Inhibitors from Soft Ticks of the Genus *Ornithodoros*. *Mol Biol Evol*. 2002; 19(10):1695–705. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003992.
- Martello E, Selmi M, Ragagli C, Ambrogi C, Stella MC, Mannelli A et al. *Rickettsia slovacica* in immature *Dermacentor marginatus* and tissues from *Apodemus* spp. in the northern Apennines, Italy. *Ticks Tick Borne Dis*. 2013; 4(6):518–21. doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.07.002.
- Mehlhorn, Heinz. Kapitel 5.3 Ticks. In: Mehlhorn, Heinz Hrsg. Human parasites. 1. Aufl. Switzerland: Springer International Publishing; 2016.
- Mejlon HA. Diel activity of *Ixodes ricinus* Acari: Ixodidae at two locations near Stockholm, Sweden. *Exp Appl Acarol*. 1997; (21):247–55.
- Merhej V, Raoult D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol Rev*. 2011; 86(2):379–405. doi: 10.1111/j.1469-185X.2010.00151.x.
- Meyer-König A, Zahler M, Gothe R. Studies on the critical water mass and the rehydration potential of unfed adult *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol*. 2001; 25(6):505–16. doi: 10.1023/a:1011827402799.
- Mierzejewska EJ, Dwużnik D, Bajer A. Molecular study of transovarial transmission of *Babesia canis* in the *Dermacentor reticulatus* tick. *Ann Agric Environ Med*. 2018; 25(4):669–71. doi: 10.26444/aaem/94673.
- Mierzejewska EJ, Welc-Faleciak R, Karbowski G, Kowalec M, Behnke JM, Bajer A. Dominance of *Dermacentor reticulatus* over *Ixodes ricinus* (Ixodidae) on livestock, companion animals and wild ruminants in eastern and central Poland. *Exp Appl Acarol*. 2015; 66(1):83–101. doi: 10.1007/s10493-015-9889-0.

- Milne A. The comparison of sheep-tick populations (*Ixodes ricinus* L.). *Ann Applied Biology*. 1943; 30(3):240–50. doi: 10.1111/j.1744-7348.1943.tb06195.x.
- Milne A. The ecology of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L.: Microhabitat economy of the adult tick. *Parasitology*. 1950; 40(1-2):14–34. doi: 10.1017/S0031182000017820.
- Moore TC, Pulscher LA, Caddell L, Fricken ME von, Anderson BD, Gonchigoo B et al. Evidence for transovarial transmission of tick-borne rickettsiae circulating in Northern Mongolia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(8):e0006696.
- Musante AR, Pekins PR, Scarpitti DL. Metabolic impacts of winter tick infestations on calf moose. *Alces*. 2007; 43: 101-110.
- Nosek J. The ecology and public health importance of *Dermaacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks in Central Europe. *Folia parasitologica*. 1972; 19(1):93–102.
- Obiegala A, Król N, Oltersdorf C, Nader J, Pfeffer M. The enzootic life-cycle of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) and tick-borne rickettsiae: an epidemiological study on wild-living small mammals and their ticks from Saxony, Germany. *Parasites Vectors*. 2017; 10(1):115. doi: 10.1186/s13071-017-2053-4.
- Obiegala A, Oltersdorf C, Silaghi C, Kiefer D, Kiefer M, Woll D et al. *Rickettsia* spp. in small mammals and their parasitizing ectoparasites from Saxony, Germany. *Vet Parasitol Reg Stud*. 2016; 5:19–24. doi: 10.1016/j.vprsr.2016.08.008.
- Obiegala A, Pfeffer M, Pfister K, Karnath C, Silaghi C. Molecular examinations of *Babesia microti* in rodents and rodent-attached ticks from urban and sylvatic habitats in Germany. *Ticks Tick Borne Dis*. 2015; 6(4):445–9. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.03.005.
- Obiegala A, Pfeffer M, Pfister K, Tiedemann T, Thiel C, Balling A et al. *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis and *Anaplasma phagocytophilum*: prevalences and investigations on a new transmission path in small mammals and ixodid ticks. *Parasites Vectors*. 2014; 7:563. doi: 10.1186/s13071-014-0563-x.
- Obiegala A, Silaghi C. *Candidatus* Neoehrlichia Mikurensis—Recent Insights and Future Perspectives on Clinical Cases, Vectors, and Reservoirs in Europe. *Curr Clin Microbiol Rep*. 2018; 5(1):1–9. doi: 10.1007/s40588-018-0085-y.
- Ohashi H, Saito M, Horie R, Tsunoda H, Noba H, Ishii H et al. Differences in the activity pattern of the wild boar *Sus scrofa* related to human disturbance. *Eur J Wildl Res*. 2013; 59(2):167–77. doi: 10.1007/s10344-012-0661-z.
- Ondruš J, Balážová A, Baláž V, Zechmeisterová K, Novobilský A, Široký P. *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis is widespread in questing *Ixodes ricinus* ticks in the Czech Republic. *Ticks Tick Borne Dis*. 2020; 11(3):101371. doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101371.
- Paddock CD. The Science and Fiction of Emerging Rickettsioses. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1166(1):133–43. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04529.x.
- Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T et al. Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World: a Geographic Approach. *Clin Microbiol Rev*. 2013; 26(4):657. doi: 10.1128/CMR.00032-13.
- Parola P, Raoult D. Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2001; 7(2):80–3. doi: 10.1046/j.1469-0691.2001.00200.x.
- Perret J-L. Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. *J Exp Biol*. 2003; 206(11):1809–15. doi: 10.1242/jeb.00345.
- Perret J-L, Guigoz E, Rais O, Gern L. Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasitol Res*. 2000; (86):554–7. doi: 10.1007/s004360000209
- Pfäffle M, Littwin N, Petney TN. Host preferences of immature *Dermaacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae) in a forest habitat in Germany. *Ticks Tick Borne Dis*. 2015; 6(4):508–15. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.04.003.
- Pfäffle M, Petney T, Elgas M, Skuballa J, Taraschewski H. Tick-induced blood loss leads to regenerative anaemia in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Parasitology*. 2009; 136(4), 443-452. doi:10.1017/S0031182009005514

- Pfeffer M, Król N, Obiegala A. (2021). Co-infections of ticks. *Climate, ticks and disease*. CABI Climate Change Series. CABI International. 2021; 264-269. doi: 10.1079/9781789249637.0038
- Portillo A, Santibáñez P, Palomar AM, Santibáñez S, Oteo JA. ‘*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*’ in Europe. *New Microbes New Infect*. 2018; 22:30–6. doi: 10.1016/j.nmni.2017.12.011.
- Prutsky G, Domecq JP, Mori L, Serge Bebeko, Melissa Matzumura, Sabouni A et al. Treatment outcomes of human bartonellosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis*. 2013; 17(10):e811 - e819. doi: 10.1016/j.ijid.2013.02.016.
- Randolph SE, Gern L, Nuttall PA. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol Today*. 1996; 12(12):472–9. doi: 10.1016/S0169-4758(96)10072-7.
- Randolph SE, Green R, Hoodless A, Peacey M. An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *Int J Parasitol*. 2002; 32(8):979–89. doi: 10.1016/S0020-7519(02)00030-9.
- Reye AL, Stegny V, Mishaeva NP, Velhin S, Hübschen JM, Ignatyev G et al. Prevalence of tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from different geographical locations in Belarus. *PLoS ONE*. 2013; 8(1):e54476. doi: 10.1371/journal.pone.0054476.
- Reynolds C, Kontschán J, Takács N, Solymosi N, Sándor AD, Keve G et al. Shift in the seasonality of ixodid ticks after a warm winter in an urban habitat with notes on morphotypes of *Ixodes ricinus* and data in support of cryptic species within *Ixodes frontalis*. *Exp Appl Acarol*. 2022; 88(1):127–38. doi: 10.1007/s10493-022-00756-1.
- Richter D, Kohn C & Matuschka FR. Absence of *Borrelia* spp., *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in questing adult *Dermacentor reticulatus* ticks. *Parasitol Res*. 2013; 112, 107–111. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3110-8>
- Robert Koch Institut (RKI). Antworten auf häufig gestellte Fragen zu Zecken, Zeckenstich, Infektion; 2019 [Zitiert vom 17.04.2020]. <https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/FSME/Zecken/Zecken.html>.
- Robert Koch Institut (RKI). Anlage zum Epidemiologischen Bulletin 9/2022. Fünfjahresinzidenz der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) in Kreisen und Kreisregionen, Deutschland, 2002 – 2021. 2022 [Zitiert vom 12.02.2023]. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2022/Ausgaben/09_22_Anlage.pdf?__blob=publicationFile
- Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000; 50(4):1449–55. doi: 10.1099/00207713-50-4-1449.
- Rubel F, Brugger K, Monazahian M, Habedank B, Dautel H, Leverenz S et al. The first German map of georeferenced ixodid tick locations. *Parasites Vectors*. 2014; 7(1):477. doi: 10.1186/s13071-014-0477-7.
- Růžek D, Yakimenko VV, Karan LS, Tkachev SE. Omsk haemorrhagic fever. *The Lancet*. 2010; 376(9758):2104–13. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61120-8.
- Samoylenko I, Shpynov S, Raoult D, Rudakov N, Fournier P-E. Evaluation of *Dermacentor* species naturally infected with *Rickettsia raoultii*. *Clin Microbiol Infect*. 2009; 15:305–6. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02249.x.
- Schaarschmidt D, Gilli U, Gottstein B, Marreros N, Kuhnert P, Daepfen JA et al. Questing *Dermacentor reticulatus* harbouring *Babesia canis* DNA associated with outbreaks of canine babesiosis in the Swiss Midlands. *Ticks Tick Borne Dis*. 2013; 4(4):334–40. doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.01.007.
- Schai-Braun SC, Rödel HG, Hackländer K. The influence of daylight regime on diurnal locomotor activity patterns of the European hare (*Lepus europaeus*) during summer. *Mamm Biol*. 2012; 77(6):434–40. doi: 10.1016/j.mambio.2012.07.004.
- Schneider H. Über epidemische akute „Meningitis serosa“. *Wiener klinische Wochenschrift* 1931; (44):350–2.

- Schorn S, Pfister K, Reulen H, Mahling M, Silaghi C. Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Parasites Vectors*. 2011; 4(1):135. doi: 10.1186/1756-3305-4-135.
- Schulz M, Mahling M, Pfister K. Abundance and seasonal activity of questing *Ixodes ricinus* ticks in their natural habitats in southern Germany in 2011. *J Vector Ecol*. 2014; 39(1):56–65. doi: 10.1111/j.1948-7134.2014.12070.x.
- Silaghi C, Pfeffer M, Kiefer D, Kiefer M, Obiegala A. *Bartonella*, Rodents, Fleas and Ticks: a Molecular Field Study on Host-Vector-Pathogen Associations in Saxony, Eastern Germany. *Microb Ecol*. 2016; 72(4):965–74. doi: 10.1007/s00248-016-0787-8.
- Silaghi C, Woll D, Mahling M, Pfister K, Pfeffer M. *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis in rodents in an area with sympatric existence of the hard ticks *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*, Germany. *Parasites Vectors*. 2012; 5(1):285. doi: 10.1186/1756-3305-5-285.
- Šimo L, Kazimirova M, Richardson J, Bonnet SI. The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7:281. doi: 10.3389/fcimb.2017.00281.
- Špitalská E, Štefanidesová K, Kocianová E, Boldiš V. *Rickettsia slovacica* and *Rickettsia raoultii* in *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from Slovak Republic. *Exp Appl Acarol*. 2012; 57(2):189–97. doi: 10.1007/s10493-012-9539-8.
- Springer A, Lindau A, Probst J, Drehmann M, Fachtet K, Thoma D et al. Update and prognosis of *Dermacentor* distribution in Germany: Nationwide occurrence of *Dermacentor reticulatus*. *Front Vet Sci*. 2022; 9(2):1044597. doi: 10.3389/fvets.2022.1044597.
- Stanek G. Durch Zecken übertragbare Krankheitserreger in Mitteleuropa. *Wien. Klein. Wochenschr*. 2005; 117(11-12):373–80.
- Süss J, Fingerle V, Hunfeld K-P, Schrader C, Wilske B. Durch Zecken übertragene humanpathogene und bisher als apathogen geltende Mikroorganismen in Europa. Teil II: Bakterien, Parasiten und Mischinfektionen. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2004; 47(5):470–86. doi: 10.1007/s00103-004-0837-0.
- Süss J, Klaus C, Gerstengarbe F-W, Werner PC. What makes ticks tick? Climate change, ticks, and tick-borne diseases. *J Travel Med*. 2008; 15(1):39–45. doi: 10.1111/j.1708-8305.2007.00176.x.
- Széll Z, Sréter-Lancz Z, Márialigeti K, Sréter T. Temporal distribution of *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* in Hungary. *Vet Parasitol*. 2006; 141(3):377–9. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.06.008.
- Tack W, Madder M, Baeten L, Frenne P de, Verheyen K. The abundance of *Ixodes ricinus* ticks depends on tree species composition and shrub cover. *Parasitology*. 2012; 139(10):1273–81. doi: 10.1017/S0031182012000625.
- Tharme AP. Ecological studies on the tick *Dermacentor reticulatus* [Ph. D. thesis]. School of Biological Sciences: Gwynedd, University of Wales; 1993.
- Tijssse-Klasen E, Fonville M, Gassner F, Nijhof AM, Hovius EKE, Jongejan F et al. Absence of zoonotic *Bartonella* species in questing ticks: first detection of *Bartonella clarridgeiae* and *Rickettsia felis* in cat fleas in the Netherlands. *Parasites Vectors*. 2011; 4:61. doi: 10.1186/1756-3305-4-61.
- Tsai Y-L, Chuang S-T, Chang C-C, Kass PH, Chomel BB. *Bartonella* species in small mammals and their ectoparasites in Taiwan. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 83(4):917–23. doi: 10.4269/ajtmh.2010.10-0083.
- Uusitalo R, Siljander M, Lindén A, Sormunen JJ, Aalto J, Hendrickx G et al. Predicting habitat suitability for *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks in Finland. *Parasites Vectors*. 2022; 15(1):310. doi: 10.1186/s13071-022-05410-8.
- Vollack K, Sodoudi S, Névir P, Müller K, Richter D. Influence of meteorological parameters during the preceding fall and winter on the questing activity of nymphal *Ixodes ricinus* ticks. *Int J Biometeorol*. 2017; 61(10):1787–95. doi: 10.1007/s00484-017-1362-9.

- Wiegmann L, Silaghi C, Obiegala A, Karnath C, Langer S, Ternes K et al. Occurrence of *Babesia* species in captive reindeer (*Rangifer tarandus*) in Germany. *Vet Parasitol.* 2015; 211(1):16–22. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.04.026.
- Wójcik-Fatla A, Bartosik K, Buczek A, Dutkiewicz J. *Babesia microti* in Adult *Dermacentor reticulatus* Ticks from Eastern Poland. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012; 12(10):841–3. doi: 10.1089/vbz.2011.0904.
- Wójcik-Fatla A, Zając V, Sawczyn A, Cisak E, Dutkiewicz J. *Babesia* spp. in questing ticks from eastern Poland: prevalence and species diversity. *Parasitol Res.* 2015; 114(8):3111–6. doi: 10.1007/s00436-015-4529-5.
- Wölfel R, Essbauer S, Dobler G. Diagnostics of tick-borne rickettsioses in Germany: A modern concept for a neglected disease. *Int J Med Microbiol.* 2008; 298:368–74. doi: 10.1016/j.ijmm.2007.11.009.
- Wongnak P, Bord S, Jacquot M, Agoulon A, Beugnet F, Bournez L et al. Meteorological and climatic variables predict the phenology of *Ixodes ricinus* nymph activity in France, accounting for habitat heterogeneity. *Sci Rep.* 2022; 12(1):7833. doi: 10.1038/s41598-022-11479-z.
- Zahler M, Gothe R. Effect of temperature and humidity on longevity of unfed adults and on oviposition of engorged females of *Dermacentor reticulatus* (Ixodidae). *Appl Parasitol.* 1995; 36(3):200–11.
- Zając Z, Bartosik K, Woźniak A. Monitoring *Dermacentor reticulatus* Host-Seeking Activity in Natural Conditions. *Insects.* 2020a; 11(5). doi: 10.3390/insects11050264.
- Zając Z, Kulisz J, Woźniak A, Bartosik K, Khan A. Seasonal activity of *Dermacentor reticulatus* ticks in the era of progressive climate change in eastern Poland. *Sci Rep.* 2021; 11(1):20382. doi: 10.1038/s41598-021-99929-y.
- Zając Z, Woźniak A, Kulisz J. Infestation of dairy cows by ticks *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) and *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) in eastern Poland. *Ann Parasitol.* 2020b; 66(1):87–96. doi: 10.17420/ap6601.241.
- Zilber LA. Spring (spring-summer) epidemical tick-borne encephalitis. *Arch Biol Nauk.* 1939; 56(2):9–37.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Landkarte der Versuchsflächen im Süden Leipzigs und in Markkleeberg	14
Abbildung 2:	Fotografien der Versuchsflächen	14
Abbildung 3:	Anteile der einzelnen Entwicklungsstadien von <i>I. ricinus</i> an der Gesamtanzahl von <i>I. ricinus</i> , aufgeschlüsselt nach Versuchsfläche.....	18
Abbildung 4:	Zeckenzahlen über den Versuchszeitraum auf Versuchsfläche AB.....	19
Abbildung 5:	Zeckenzahlen über den Versuchszeitraum auf Versuchsfläche EW	19
Abbildung 6:	Zeckenzahlen über den Versuchszeitraum auf Versuchsfläche WR	20
Abbildung 7:	Aktivität von <i>I. ricinus</i> auf Versuchsfläche AB nach Tageszeiten	20
Abbildung 8:	Aktivität von <i>I. ricinus</i> auf Versuchsfläche EW nach Tageszeiten.....	21
Abbildung 9:	Aktivität von <i>I. ricinus</i> auf Versuchsfläche WR nach Tageszeiten	22
Abbildung 10:	Aktivität von <i>D. reticulatus</i> auf Versuchsfläche WR nach Tageszeiten	22
Abbildung 11:	ventrale und dorsale Ansicht einer der geflaggten <i>D. reticulatus</i> -Larven	26
Abbildung 12:	ventrale und dorsale Ansicht einer der geflaggten <i>D. reticulatus</i> -Nymphen.....	27

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Details zu Primern und PCR-Untersuchungen für die Speziesidentifikation der juvenilen Stadien von <i>D. reticulatus</i> und Detektion von zeckenübertragenen Pathogenen aus den Zecken	16
Tabelle 2:	Gesamtanzahl der Zeckenarten und -stadien auf den Versuchsflächen	17
Tabelle 3:	Vergleich der durchschnittlichen Zeckenzahlen bei verschiedenen Lichtbedingungen	24
Tabelle 4:	Umweltdaten der Funde von juvenilen Stadien von <i>D. reticulatus</i>	25
Tabelle 5:	Reagenzienmix zum Nachweis von <i>Babesia</i> spp. mittels konventioneller PCR.....	53
Tabelle 6:	Thermoprofil der PCR zum Nachweis von <i>Babesia</i> spp.	53
Tabelle 7:	Reagenzienmix zum Nachweis von <i>Bartonella</i> spp mittels konventioneller PCR.....	53
Tabelle 8:	Thermoprofil der PCR zum Nachweis von <i>Bartonella</i> spp.	53
Tabelle 9:	Reagenzienmix zum Nachweis von <i>N. mikurensis</i> mittels Real-Time PCR.....	54
Tabelle 10:	Thermoprofil zum Nachweis von <i>N. mikurensis</i>	54
Tabelle 11:	Reagenzienmix zum Nachweis von <i>Rickettsia</i> spp mittels Real-Time PCR.....	54
Tabelle 12:	Thermoprofil zum Nachweis von <i>Rickettsia</i> spp.....	54
Tabelle 13:	Reagenzienmix zum Nachweis des OmbP-Gens für die Bestimmung von <i>Rickettsia</i> spp. mittels konventioneller PCR.....	54
Tabelle 14:	Thermoprofil zum Nachweis des OmbP-Gens für die Bestimmung von <i>Rickettsia</i> spp. mittels konventioneller PCR.....	54

11. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Allen bedanken, die dieses Promotionsverfahren möglich gemacht haben. Zunächst danke ich Martin Pfeffer für das gemeinsame Brainstormen des Themas, die Betreuung, dafür, dass man immer zusammen lachen konnte, dafür, dass er sich trotz seiner Angst vor Wildschweinen für diese Studie nachts im Wald herumgetrieben hat und dafür, dass er trotz aller Hindernisse nicht den Glauben an diese Forschungsarbeit verloren hat.

Des Weiteren danke ich dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Universität Leipzig dafür, dass ich mich als angestellte Wissenschaftliche Mitarbeiterin viel auf meine Forschung konzentrieren konnte sowie für die Bereitstellung des Dienstfahrzeuges. Auch sämtlichen Mitarbeitern gilt mein Dank, insbesondere Dana Rüster, Anna Obiegala und Nina Król für die Hilfe bei der Laborarbeit sowie Anna und Nina für Korrekturen und Mitarbeit bei meinen Manuskripten. Sämtlichen Doktoranden des Instituts danke ich für den Zusammenhalt und den Spaß, es war eine tolle Zeit mit euch! Hier sind die Mitarbeiter, die mir bei meiner Feldarbeit geholfen haben, natürlich noch einmal explizit zu nennen. Danke Lisa Nau, Nina Król, Anna Obiegala, Martin Pfeffer (in unserer Arbeitsgruppe flaggt der Chef noch persönlich!), Mario Reinhardt und natürlich meinem größten Leidensgenossen Philipp Koch.

Dr. Lidia Chitimia-Dobler und Dr. Gerhard Dobler danke ich für die Unterstützung bei der Identifikation der juvenilen Stadien von *Dermacentor reticulatus* sowie für die sonstige fachliche Unterstützung. PD Dr. Johannes Kacza danke ich für die tollen Aufnahmen von meinen Zecken mittels konfokaler Lasermikroskopie. Für die finanzielle Unterstützung danke ich Pfizer Inc. und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung.

Von privater Seite möchte ich an erster Stelle meiner Familie danken. Danke an meine Mutter und meinen Vater für die Liebe und Unterstützung, die ich bei jedem Schritt meines Lebens erfahren durfte. Ich danke meinem Bruder Felix dafür, dass er der beste große Bruder ist, den ich mir je hätte wünschen können, und meiner Oma Christel dafür, dass sie einfach ein toller Mensch ist. Ich danke allen meinen Freunden sowie meinen Trainingskollegen vom Brazilian Jiu Jitsu dafür, dass sie mir einen Ausgleich zu meiner Arbeit gebildet haben und mich damit vor dem Wahnsinn bewahren konnten. Meiner besten Freundin Gene danke ich dafür, dass sie mich während meiner Zeit in Leipzig immer wieder aufgerichtet hat und dafür, dass sie mir trotz der jetzt so großen Entfernung immer nah bleibt. Zu guter Letzt danke ich Manuel dafür, dass er mein schwindendes Nervenkostüm immer wieder geflickt, mich sprachlich und grammatikalisch beim Schreiben der Dissertationsschrift unterstützt und sich mit mir durch die Tücken von Microsoft Word gekämpft hat.

12. Anhang

12.1 PCR-Protokolle zum Nachweis von *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Neoehrlichia mikurensis* und *Rickettsia* spp.

Tabelle 5: Reagenzienmix zum Nachweis von *Babesia* spp. mittels konventioneller PCR

Reagenzien	µl/Reaktion
Primer BJ1	2,5
Primer BN2	2,5
HotStar Taq DNA Mastermix	12,5
Molekularbiologisch reines Wasser	4,5
Probe	3
Gesamtvolumen	25

Tabelle 6: Thermoprofil der PCR zum Nachweis von *Babesia* spp.

PCR-Schritt	Zeit	Temperatur (in °C)	Wiederholungen
Aktivierung	15 min.	95	-
Denaturierung	30 sek.	94	40
Annealing	30 sek.	58	40
Elongation	40 sek.	72	40
Finale Elongation	5 min.	72	-

Tabelle 7: Reagenzienmix zum Nachweis von *Bartonella* spp mittels konventioneller PCR.

Reagenzien	µl/Reaktion
Primer Ba325s	1
Primer Ba1100as	1
HotStar Taq DNA Mastermix	12,5
Molekularbiologisch reines Wasser	7,5
Probe	3
Gesamtvolumen	25

Tabelle 8: Thermoprofil der PCR zum Nachweis von *Bartonella* spp.

PCR-Schritt	Zeit	Temperatur (in °C)	Wiederholungen
Aktivierung	15 min.	95	-
Denaturierung	30 sek.	94	40
Annealing	30 sek.	66	40
Elongation	50 sek.	72	40
Finale Elongation	5 min.	72	-

Tabelle 9: Reagenzienmix zum Nachweis von *N. mikurensis* mittels Real-Time PCR

Reagenzien	µl/Reaktion
LC DNA Master Hybridization Probes	2
Molekularbiologisch reines Wasser	8,6
NMikGroEL-F2	1,6
NMikGroEL-rev1	0,8
NMikGroEL-rev2	0,8
NMikGroEL-P2a	0,4
MgCl ₂	2,8
Probe	3
Gesamtvolumen	20

Tabelle 10: Thermoprofil zum Nachweis von *N. mikurensis*

PCR-Schritt	Zeit	Temperatur (in °C)	Wiederholungen
Aktivierung	10 min.	95	-
Denaturierung	25 sek.	95	45
Annealing	30 sek.	60	45
Elongation	30 sek.	72	45

Tabelle 11: Reagenzienmix zum Nachweis von *Rickettsia* spp mittels Real-Time PCR

Reagenzien	µl/Reaktion
LC DNA Master Hybridization Probes	2
Molekularbiologisch reines Wasser	11,25
Pan Rick gltA_2 for	1,25
Pan Rick gltA_2 rev	1,25
Pan Rick gltA_3 taq	0,25
MgCl ₂	4
Probe	5
Gesamtvolumen	25

Tabelle 12: Thermoprofil zum Nachweis von *Rickettsia* spp.

PCR-Schritt	Zeit	Temperatur (in °C)	Wiederholungen
Aktivierung	10 min.	95	-
Denaturierung	25 sek.	95	45
Annealing	30 sek.	55	45
Elongation	30 sek.	72	45

Tabelle 13: Reagenzienmix zum Nachweis des OmbP-Gens für die Bestimmung von *Rickettsia* spp. mittels konventioneller PCR

Reagenzien	µl/Reaktion
Primer 120-2788	1,25
Primer 120-3599	1,25
MgSO ₄	2
Puffer	2,5
dNTPs	0,5
Invitrogen Platinum Taq	0,1
Molekularbiologisch reines Wasser	14,9
Probe	2,5
Gesamtvolumen	25

Tabelle 14: Thermoprofil zum Nachweis des OmbP-Gens für die Bestimmung von *Rickettsia* spp. mittels konventioneller PCR

PCR-Schritt	Zeit	Temperatur (in °C)	Wiederholungen
Aktivierung	3 min.	94	-
Denaturierung	30 sek.	95	40
Annealing	30 sek.	50	40
Elongation	1,5 min.	68	40
Finale Elongation	7 min.	68	-

12.2 Publikation

Teilergebnisse dieser Dissertationsschrift wurden bereits in „Ticks and Tick borne Diseases“ 2020 vorab wie folgt publiziert:



Original article

Collection of immature *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) ticks from vegetation and detection of *Rickettsia raoultii* in them

Hannah M. Schmuck^a, Lidia Chitimia-Dobler^b, Nina Król^a, Johannes Kacza^c, Martin Pfeffer^{a, *}

^a Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, D-04103 Leipzig, Germany

^b Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich, Germany

^c Bioluminescence Core Facility, Faculty of Veterinary Medicine, Saxon Incubator for Clinical Translation, University of Leipzig, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Dermacentor reticulatus larvae
nymphs
flagging
Rickettsia spp.

ABSTRACT

It is commonly assumed that *Dermacentor reticulatus* immature life stages are nidicolous and therefore cannot be collected from vegetation. However, in June and July of 2018 and 2019, a total of 47 questing *D. reticulatus* larvae and two nymphs were collected by the flagging method in two different sites close to the city of Leipzig, Germany. To confirm their role in the transmission of tick-borne pathogens, 45 larvae (pooled by 2 in 21 pools and 1 pool with three individuals) and one nymph were tested either by conventional or real-time PCR for the presence of *Bartonella* spp., *Neoehrlichia mikurensis*, *Rickettsia* spp., and *Babesia* spp. All samples tested negative for *Bartonella* spp., *N. mikurensis*, and *Babesia* spp.; while the minimal infection rate of larvae for *Rickettsia* spp. was 42%, and the one tested nymph was also positive. Sequencing partial *ompB* genes revealed the presence of *Rickettsia raoultii* in larvae and nymph. Further research needs to be done to determine under which circumstances immature *D. reticulatus* ticks are found outside the burrows of their hosts and can be collected from vegetation.

1. Introduction

Dermacentor reticulatus is one of the three most common tick species in Germany (Rubel et al., 2014). Its geographical distribution in Germany covers mostly the north-eastern part of the country (states of Brandenburg, Berlin, Saxony, Saxony-Anhalt and Thuringia) (Rubel et al., 2014).

The exophilic *D. reticulatus* adults are mostly active in spring and autumn, waiting for hosts on vegetation, therefore they can be collected by the flagging method, while the immature stages are mostly collected from hosts (Földvári et al., 2016; Obiegala et al., 2016; Obiegala et al., 2017). They are widely assumed to be nidicolous, although to the authors' knowledge, up to the present date no reports of collection of immature *D. reticulatus* from or near host burrows have been published. Juveniles are only active for a short time during the summer. The larvae are mostly collected from rodents in June and July, while nymphs are mostly collected in July and August (Tharme, 1993; Pfäffle et al., 2015; Földvári et al., 2016; Kohn et al., 2019). Although immature *D. reticulatus* tick stages have been collected previously by flagging, they were only found as individual specimens, i.e. two larvae and one nymph

in 1988 (Tharme, 1993). In a National Park in the Northern Alpennines, larger quantities of *Dermacentor marginatus*, a tick species closely related to *D. reticulatus*, were found by using the dragging method, although the density was rather small with only up to 9.36 larvae per kilometre (Manelli et al., 1997).

The hosts of *D. reticulatus* larvae and nymphs are small mammals such as voles, mice, shrews, hares, rabbits, and hedgehogs (Nosek, 1972; Obiegala et al., 2014; Földvári et al., 2016; Galfsky et al., 2019). In rare instances, they have also been found on birds (Akimov and Nebogatkin, 2011). Additionally, nymphs might feed on dogs (Andersson et al., 2017; Hornok et al., 2012), cervids, polecats, and weasels (Nosek, 1972). Their frequent occurrence on wild mammals suggests that they play a role in the maintenance of enzootic cycles of certain pathogens. Adults have been found on numerous wild and domestic medium- and large-sized animals, e.g. cervids, wild boars, red foxes and bison, dogs, goats, sheep, cattle, cats as well as hedgehogs, hares, and rabbits (Nosek, 1972; Széll et al., 2006; Hornok et al., 2012; Chitimia-Dobler, 2015; Mierzejewska et al., 2015; Földvári et al., 2016).

Dermacentor reticulatus is an important vector of pathogens, causing diseases such as canine babesiosis, rickettsioses, Omsk haemorrhagic

* Corresponding author at: Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, D-04103 Leipzig, Germany.

E-mail address: ppfeffer@vetmed.uni-leipzig.de (M. Pfeffer).

<https://doi.org/10.1016/j.tbd.2020.101543>

Received 17 May 2020; Received in revised form 4 August 2020; Accepted 19 August 2020

Available online 24 August 2020

1877-959X/© 2020 Elsevier GmbH. All rights reserved.

fever, and tick-borne encephalitis (Růžek et al., 2010; Wójcik-Fatla et al., 2011; Parola et al., 2013; Schaarschmidt et al., 2013; Biernat et al., 2014; Földvári et al., 2016; Chitimiya-Dobler et al., 2019). Previous studies in the surroundings of Leipzig have reported the presence of *Babesia* spp. and a high prevalence of *Rickettsia* spp. in questing *D. reticulatus* adults (Galfsky et al., 2019), and DNA of *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp., as well as *Neoehrlichia mikurensis* in *D. reticulatus* immatures attached to rodents (Obiegala et al., 2014; Silaghi et al., 2016; Obiegala et al., 2017; Galfsky et al., 2019).

Bartonella spp. are vector-borne Gram-negative bacteria. These alpha-proteobacteria (order Rhizobiales, family Bartonellaceae) are facultative intracellular pathogens and can cause severe illness in animals and humans, e.g. cat scratch disease (Prutsky et al., 2013). They have been found in several arthropods such as fleas, lice, and keds (Halos et al., 2004; Tsai et al., 2010; Silaghi et al., 2016). The vector competence of *I. ricinus* has been demonstrated for *B. henselae* (Cotté et al., 2008), even though epidemiological significance remains unclear, but it is still not clear if *D. reticulatus* is a vector for *Bartonella* spp. The reservoirs for most *Bartonella* species are rodents (Silaghi et al., 2016).

Neoehrlichia mikurensis is a tick-borne, Gram-negative, obligate intracellular bacterium. It is mainly transmitted by *I. ricinus* (Andersson et al., 2013) but has also been found to be carried by *D. reticulatus* (Obiegala et al., 2014). It mainly causes febrile disease and vascular complications in immunosuppressed humans (von Loewenich et al., 2010; Obiegala and Silaghi, 2018). The reservoirs for *N. mikurensis* are small rodents mainly of the genera *Myodes*, *Microtus*, and *Apodemus* (Obiegala and Silaghi, 2018). The pathogen is widespread throughout Europe and is mostly transmitted by *I. ricinus* (Portillo et al., 2018).

Rickettsia spp. are Gram-negative, obligate intracellular bacteria and can be subdivided into four groups: the spotted fever group (SFG), the typhus group, the *Rickettsia bellii* group, and the *Rickettsia canadensis* group. *Rickettsia* spp. are mostly known as pathogens of vertebrate hosts transmitted by haematophagous arthropods (Merhej and Raoult, 2011). The SFG consists of mostly zoonotic and tick-borne rickettsiae (Parola et al., 2013). *Rickettsia raoultii* is categorized in this group and can cause a range of symptoms from mild to severe febrile disease as well as SENLAT syndrome (scalp eschar and neck lymphadenopathy after tick bite) in humans (Foissac et al., 2013; Földvári et al., 2013). In the temperate climate zone of Europe, it seems to be mainly transmitted by *D. reticulatus*. Furthermore, *D. reticulatus* is a suspected vector for *R. sibirica* subsp. *sibirica* and *R. slovaca* (Špitalská et al., 2012; Földvári et al., 2013; Parola et al., 2013). High transovarial transmission rates for different *Rickettsia* spp. and filial infection rates close to 100% have been observed in several studies for *Dermacentor* spp. (Macaluso et al., 2001; Alberdi et al., 2012; Parola et al., 2013; Moore et al., 2018), although, to the authors' present knowledge, no studies investigating *Rickettsia* species in field-collected immature *D. reticulatus* tick stages have been performed.

Babesia spp. are apicomplexan protozoa parasitizing the erythrocytes of different vertebrate species. Human infections in Europe are rather rare and caused mostly by *B. divergens*, while infections with *B. microti* and *B. venatorum* have been reported less often (Krause, 2019). *Dermacentor reticulatus* is a vector of *B. caballi* and *B. canis*, causing equine and canine babesiosis, while zoonotic *B. microti* and *B. divergens* are transmitted by *I. ricinus* (Gray et al., 2019). Furthermore, *B. microti* has also been detected in questing *D. reticulatus*, although vector competence has not been proven yet (Wójcik-Fatla et al., 2012; Galfsky et al., 2019).

2. Materials and methods

2.1. Collection of ticks from vegetation by flagging

Ticks were collected by the flagging method in two different locations in the surroundings of Leipzig, Germany, once per month from June 2018 to November 2019 (except for December and January). The collection was performed on a randomly selected 100 m transect at each

of the two sites. At each sampling session, time, temperature and relative humidity (RH) were measured approximately 2 cm above ground using a portable Ehdiss LH500 thermo-hygrometer (Ehdiss, China). The flag was checked every 10 m, ticks were collected into a tube and brought to the laboratory. Subsequently, the ticks were frozen at -80°C for at least 3 days until further examination.

Both sites are located south of Leipzig near the Cospuden lake in the rural district. The first one, named EW (51.261016 N, 12.352048 E), is a plantation of mostly young northern red oak, some birch trees, and small quantities of other bushes and trees. This site has a rich layer of leaf litter with almost no ground vegetation. The second site, WR (51.258953 N, 12.342666 E), is a grassy wayside at the border of an oak plantation only a few hundred meters away from the lake. The distance between the two sites is approximately 700 m. The sites are characterized by the high activity of wild boar, while rodent holes in the ground are rare. Other mammals, such as roe deer, foxes and raccoons, have been observed in this area as well.

2.2. Tick species identification and methods for the detection of pathogens

The immatures of *D. reticulatus* were identified using morphological keys (Filippova, 1997). For photography, a Keyence VH-900 Microscope (Keyence Deutschland GmbH) with 200x magnifications was used. The identification of juveniles of *D. reticulatus* was achieved by molecular analyses. DNA extraction is described below. The 16S rRNA gene sequence was amplified according to Mangold et al. (1998). PCR product was visualized in a 1% agarose gel and was afterwards purified using the QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Sequencing of the amplification product was performed by GATC sequencing service (Konstanz, Germany). The obtained sequence was analysed with BioNumerics v.7.6 (Applied Maths NV, Austin, TX, USA) and compared with those available in GenBank using the BLAST algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The sequence was uploaded to GenBank under accession number MT430883.

For DNA extraction to test for pathogens, larvae ($n = 45$) were pooled by two (21 pools) and one pool consisting of three individuals. One of the two collected nymphs was processed individually. The tick samples were added to 1.6 g of sterile steel beads (sized 2.8 mm, Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Germany) and 165 μl of phosphate-buffered saline. The samples were then homogenized at 5000x rpm for 2×30 s with 15 s break interval in a Precellys®24 tissue homogenizer (Bertin Technologies, Montigny Le Bretonneux, France). The DNA was extracted using a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

The DNA samples were then screened for the presence of *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp., *Babesia* spp., and *N. mikurensis*. For *Rickettsia* spp., a real-time PCR targeting the *gltA* gene [70 base pairs (bp)] was performed as described (Wölfel et al., 2008). Samples shown as positive by real-time PCR were further investigated using a conventional PCR in which an 811-bp fragment of the *ompB* gene was amplified (Roux and Raoult, 2000). *Bartonella* spp. were tested using a conventional PCR targeting a fragment of the 16S-23S rRNA ITS region (453-780 bp; Maggi et al., 2006). Furthermore, for *N. mikurensis*, a real-time PCR targeting a 99-bp fragment of the *groEL* gene was performed (Jahfari et al., 2012; Silaghi et al., 2012) and, for *Babesia* spp., a conventional PCR was performed using the primers BJ1 and BN2 targeting the 18S rRNA gene (411–452bp; Casati et al., 2006). A more detailed list of used primers and PCR assays used for tick identification and detection of pathogens can be seen in Table 1.

All positive samples were purified using the NucleoSpin® Gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) according to the instructions provided by the manufacturer and were then commercially sequenced (Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung, Leipzig, Germany). The sequences ($n = 18$) were uploaded to GenBank under the following accession numbers: MT434877 to MT434895.

Table 1
Details on primers and PCR assays used for the species identification of ticks collected and the detection of tick-borne pathogens from ticks

Investigated Species	PCR ^a	Primer name	Primer/probe sequence (5'-3')	Gene (amplicon size in bp ^b)	Reference
<i>Dermacentor reticulatus</i>	C	16S +1 16S -1	CCGGTCTGAACCTCAGATCAAGT GCTCAATGATTTTTAAATGCTGT	part of the 16S rRNA gene (460)	Mangold et al., 1998
<i>Bartonella</i> spp.	C	Ba325 s Ba1100as	CTTCAGATGATGATCCCAAGCCTCTGGCG GAACCGACGACCCCTGCTGCAAAGC CCITGAAAATATAGCAAGATCAGGTAG	16S-23S rRNA (ITS) (453-780)	Maggi et al., 2006
<i>Neohrlithia mikurensis</i>	Real-time	NMikGroEL F2 NMikGroEL rev1 NMikGroEL rev2 NMikGroEL-P2a	CCACACGTAACCTATTAGCACTAAAG CCACACGTAACCTATTAGCACTAAAG FAM- CCTCTACTAATTATTGCTGAAGATGAGAAGGTGAAGC-BHQ1	groEL (99)	Jahfari et al., 2012; Sillaghi et al., 2012
<i>Rickettsia</i> spp.	Real-time	Pan Rick gItA_2 for Pan Rick gItA_2 rev Pan Rick gItA_3 taq	ATAGGACAACCGTTTATT CAAACATCATATGCAGAAA 6FAM- CCTGATAATTCGTTAGATTTTACCG-TMR	gItA (70)	Wölfel et al., 2008
<i>Rickettsia</i> spp.	C ^b	120-2788 120-3599	AAACAATAATCAAGGTACTGT TACTTCCGGTTACAGCAAAGT	OmpB (811)	Roux and Raoult, 2000
<i>Babesia</i> spp.	C	BJ1 BN2	GTCTTGTAATTGGAATGATGG TAGTTTATGGTTAGGACTACG	18S rRNA (411-452)	Casati et al., 2006

^a C, conventional PCR; Real-time, real-time PCR.

^b conventional PCR was only carried out on samples with positive real-time PCR.

^c bp, base pairs.

As the larvae samples were pooled, the prevalence is given as the minimum infection rate (MIR), which is defined as the ratio of the number of positive pools to the total number of ticks tested, assuming one infected individual per pool.

2.3. Confocal laser scanning microscopy

Dermacentor reticulatus ticks were mounted on glass slides with glycerol gelatine (Merck, Darmstadt, Germany). A Leica SP8 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, Darmstadt, Germany) with a 20 × 0.75 Glyc lens was used for imaging. For the excitation of autofluorescence, a 561 nm laser and a detector range between 566 and 694 nm were applied. Tile scans (3 × 3) including 200 scanned layers, each with a resolution of 1024 × 1024 pixels, were recorded to create a volume with a total dimension of 1498 × 1484 × 90 μm. After deconvolution of the confocal data with a theoretical point spread function using Huygens Professional 19.10 (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Netherlands), 3D-visualization was performed with Imaris 9.1.2 (Bitplane, Zurich, Switzerland) using the normal shading mode.

3. Results

In total, 47 larvae and two nymphs of *D. reticulatus* were collected from vegetation. Larvae were collected during summer (June and July) at both sites, while nymphs were found only once in July at the EW spot (Table 2).

Table 2
Dermacentor reticulatus immatures collected from vegetation and meteorological data, Leipzig, Germany, 2018-2019.

Spot	Date	Time of day	Number of collected <i>D. reticulatus</i>		Temperature (°C)	Relative humidity	Weather conditions	
			nymphs	larvae				
Oak plantation (EW)	June 19, 2018	17:30	0	6	25.0	NDA	cloudy	
	June 21, 2019	09:30	0	8	19	NDA	NDA	
	June 26, 2019	21:30	0	9	29	53.3%	cloudless	
	June 27, 2019	05:45	0	3	19.2	68.3%	cloudless	
	June 27, 2019	14:00	0	1	29.8	25.5%	sunny	
	June 27, 2019	17:30	0	6	28.2	29.5%	NDA	
	July 23, 2019	09:30	1	0	24.3	62.7%	sunny	
	July 23, 2019	13:45	1	1	30.3	45.5%	sunny	
	Total			2	26			
	Wayside (WR)	June 19, 2018	18:00	0	15	25	NDA	cloudy
June 26, 2019		22:05	0	5	28.6	54.0%	dusk	
June 27, 2019		06:15	0	1	19.6	67.5%	cloudy, windy	
Total				0	21			

NDA – no data available

All collected larvae (Fig. 1) and nymphs (Fig. 2) were identified as *D. reticulatus* based on morphological features. In the nymphs, the basis capituli presents itself with a straight media posterior margin before diverging to lateral points at about one third of basis length, while the posterior-ventral margin has two posterior prominences. The scutum is longer than broad and sharply rounded in the back. Spiracles are small and oval, with three fine goblets rows, and coxa I has blunt internal and external spurs that are close together (Fig. 2). The basis capituli of the larva is very similar to the nymph's, only shorter. The palpi appear shorter and thicker, and the suture line between segments 2 and 3 is indistinct (inlet in Fig. 3). The scutum is broader than long, while broadest near the posterior margin where the eyes are situated. The eyes as well as the 11 festoons can be seen in Fig. 3.

The sequence of 16S rRNA genes of the tick examined in this study (GenBank Acc. No. MT430883) showed 100% identity to *D. reticulatus* ticks (Acc. No. KC427891).

The MIR of larvae for *Rickettsia* spp. was 42.2%. (real-time PCR: 18 of 22 larvae pools positive, *ompB*-conventional PCR: 17 larvae pools positive). The one tested nymph was likewise positive in both PCRs. The sequencing revealed the presence of *R. raoultii* in all conventional PCR positive larvae pools as well as the nymph. All obtained sequences (n = 18) showed 100% identity to GenBank Acc. No. MG811717. All samples tested negative for the other pathogens.



Fig. 1. Field-collected *Dermacentor reticulatus* larva; A, dorsal view; B, ventral view.

4. Discussion

Data about immature *D. reticulatus* collected from vegetation is extremely scarce and, so far, only small numbers (up to three specimens) have been reported (Tharme, 1993). To our knowledge, this is the first report of a repeated collection of larger numbers of *D. reticulatus* larvae.

Hatching success and survival of *D. reticulatus* larvae seem to be related to temperature and humidity. In laboratory experiments, larvae only hatched between 20 and 34 °C and most successfully between 24 and 27 °C with a relative humidity of 100%. The survival rate for larvae is the highest at 100% RH, regardless of the temperature (Zahler and Gothe, 1995). However, in this study, the larvae and nymphs were collected at warm temperatures over 30 °C and in rather dry conditions, at 25.5% RH. This shows that they may tolerate conditions of low humidity, at least for a short period. However, one should consider that the measured parameters were taken a few centimetres above ground. Therefore, the conditions of the microclimate under the leaf litter or grass cover could be more favourable for the development of eggs and survival of immatures, e.g. providing higher humidity (Estrada-Pena et al., 2013). The seasonal activity of larvae and nymphs in this study is in line with previous findings (Nosek, 1972; Tharme, 1993; Pfäffle et al., 2015).

Interestingly, most larvae and the only two nymphs were collected at the EW site, where the abundance of *D. reticulatus* adults is low. This might be explained by the different range of hosts for adults and juveniles. Females can be attached to and feed on hosts for up to 11 days (Nosek, 1972), e.g. wild boar, which are abundant in these areas and have a home range of $4.01 \pm 0.2 \text{ km}^2$ in human-dominated



Fig. 2. Field-collected *Dermacentor reticulatus* nymph; A, dorsal view; B, ventral view.

agro-ecosystems (Fattebert et al., 2017). Suspecting that the female tick dropped off in the area where rodent hosts are rare, hatched larvae could not find the hosts at ground level. Therefore, they could have been exposed on the ground cover or leaf litter surface longer and could thus be collected by flagging.

Our findings underline how important it is to identify all flagged larvae to the species level, as there is a probability of finding ticks which are not normally collected from vegetation. The risk of misidentification is even more probable for *Ixodes* spp. immature life stages. With this negligent approach, e.g. *I. inopinatus* or *I. frontalis* ticks could be considered as *I. ricinus* and therefore overlooked in certain areas (Heylen et al., 2014; Agoulon et al., 2019; Drehmann et al., 2019; Kahl et al., 2019).

Further investigations are needed to conclude whether the collection of *D. reticulatus* immatures by the flagging method is an occasional incident or whether it is possible to collect them from vegetation regularly during the time of their highest activity. As there are numerous studies investigating the activity of adult *D. reticulatus* ticks that did not find immature stages of *D. reticulatus* ticks, the event might be rare and linked to certain circumstances that have not been established yet. Therefore, systematic studies trying to find immature *D. reticulatus* by flagging might be frustrating. Nevertheless, it is important to bear in mind that collection of these stages with the flagging method is indeed possible.



Fig. 3. Confocal laser scanning microscopy image of *Dermacentor reticulatus* larva. The 11 festoons on the idiosoma and the eyes at the rim of the scutum can be easily distinguished. The inset shows the capitulum of a *Dermacentor reticulatus* larva allowing details of the chelicera, palpi and basis capitula morphology to be seen.

Concerning *Bartonella* spp., our results are in line with the current knowledge that *D. reticulatus* has not yet been proven to be a vector and that there are no studies confirming transovarial transmission in this tick species (Billeter et al., 2008).

In questing *D. reticulatus* adults, prevalences for *Rickettsia* spp. of 25.75% (Spitalská et al., 2012) up to 76.9% (Galfsky et al., 2019) have been reported. Adult *D. reticulatus* ticks collected from animals showed a prevalence of up to 28.76% in the Slovak Republic (Spitalská et al., 2012). In Germany, *Rickettsia* spp. was detected in 20% of larvae and 78.4% of nymphs collected from rodents (Galfsky et al., 2019). As questing and attached *D. reticulatus* ticks with the high prevalences were collected only a few kilometres away from our flagging locations (Galfsky et al., 2019) and the transovarial transmission of *R. raoultii* occurs in this tick species, it was probable to detect this pathogen in field-collected immatures.

When detecting *Rickettsia* spp. in ticks, one should always consider that some *Rickettsia* spp. are tick endosymbionts and not pathogens (Parola et al., 2013). In this study, this can be ruled out as we did sequencing analyses confirming that indeed *R. raoultii* had been detected, a pathogenic *Rickettsia* species. The detection of *R. raoultii* in field-collected *D. reticulatus* larvae with a high MIR confirms the laboratory findings of the transovarial transmission of this *Rickettsia* species in *D. reticulatus* ticks (Alberdi et al., 2012). As the *Rickettsia* spp. have been detected in larvae which had been flagged at different spots (and within the spots at different places) at different times and dates, it is very unlikely that the larvae derived from one single infected female. In a study performed in Romania, two different genotypes of *R. raoultii* were found using sequencing of the 23S ribosomal gene. They differed in a 60 bp insertion/deletion (Andersson et al., 2018). As we applied a different methodology, we cannot state anything about the occurrence of these two genotypes in our study area.

Transovarial transmission of *Babesia canis* in *D. reticulatus* has been proven in laboratory experiments (Mierzejewska et al., 2018). However, in the current study as well as during previous research performed near to the areas investigated here, *Babesia* spp. could not be detected in immature *D. reticulatus* (non-engorged and attached to rodents); it was found only in *D. reticulatus* adults, with a low prevalence of 3.8%

(Obiegala et al., 2015; Galfsky et al., 2019). This is in line with findings from Eastern Poland, where *Babesia* spp. were detected in questing *D. reticulatus* adults, also with low prevalence (2.7%) (Wójcik-Fatla et al., 2015).

5. Conclusion

During the appropriate time of year, e.g. June and July, *D. reticulatus* immatures might be collected from vegetation, but further investigations have to show whether the collection of *D. reticulatus* immatures by flagging is linked to certain weather conditions or a small timeframe of activity of these life stages, or if it is connected to a specific habitat and ecosystem. This information is not only important for our knowledge about the ecology of *D. reticulatus* but also for a better understanding of the transmission of tick-borne diseases. The detection of *R. raoultii* in *D. reticulatus* larvae from the field confirms that transovarial transmission might be an efficient way of maintaining the infection cycle of this pathogen.

Authors statement

All authors have worked on the resubmitted version of our manuscript and agreed with its resubmission.

Acknowledgements

The authors would like to thank Lisa Nau, Philipp Koch and Maja Haut for their assistance with flagging and Dana Rüster and Anna Obiegala for their help with the laboratory tests. This work is in part financially supported by Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Project No. WI211158 "Characterization of TBE viruses from Saxony", and BMBF (Federal Ministry of Education and Research) network project TBEN-AGER (FKZ 01KI1728D).

References

- Agoulon, A., Hoch, T., Heylen, D., Chalvet-Monfray, K., Plantard, O., 2019. Unravelling the phenology of *Ixodes frontalis*, a common but understudied tick species in Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* 10, 505–512. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.12.009>.
- Akimov, I., Nebogatkin, I., 2011. Distribution of ticks from the genus *Dermacentor* (Acari, Ixodidae) in Ukraine. *Vestn. Zool.* 45, e-1–e-6. <https://doi.org/10.2478/v10058-011-0001-x>.
- Alberdi, M.P., Nijhof, A.M., Jongejan, F., Bell-Sakyi, L., 2012. Tick cell culture isolation and growth of *Rickettsia raoultii* from Dutch *Dermacentor reticulatus* ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* 3, 349–354. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.020>.
- Andersson, M.O., Bartkova, S., Lindestad, O., Råberg, L., 2013. Co-infection with *Candidatus* Neohhrlichia mikurensis and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks in Southern Sweden. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 13, 438–442. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1118>.
- Andersson, M.O., Tolf, C., Tamba, P., Stefanache, M., Radbea, G., Frangoulidis, D., Tomaso, H., Waldenström, J., Dobler, G., Chitimia-Dobler, L., 2018. Molecular survey of neglected bacterial pathogens reveals an abundant diversity of species and genotypes in ticks collected from animal hosts across Romania. *Parasite Vector* 11, 144. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2756-1>.
- Andersson, M.O., Tolf, C., Tamba, P., Stefanache, M., Radbea, G., Rubel, F., Waldenström, J., Dobler, G., Chitimia-Dobler, L., 2017. *Babesia*, *Theileria*, and *Hepatozoon* species in ticks infesting animal hosts in Romania. *Parasitol. Res.* 116, 2291–2297. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5537-4>.
- Biernat, B., Karbowski, G., Werszko, J., Stańczak, J., 2014. Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) RNA in *Dermacentor reticulatus* ticks from natural and urban environment, Poland. *Exp. Appl. Acarol.* 64, 543–551. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9836-5>.
- Billetter, S.A., Levy, M.G., Chomel, B.B., Breitschwerdt, E.B., 2008. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med. Vet. Entomol.* 22, 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00713.x>.
- Casati, S., Sager, H., Gern, L., Piffaretti, J., 2006. Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Ann. Agr. Env. Med.* 13, 65–70.
- Chitimia-Dobler, L., 2015. Spatial distribution of *Dermacentor reticulatus* in Romania. *Vet. Parasitol.* 214, 219–223. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.09.018>.
- Chitimia-Dobler, L., Lemhöfer, G., Król, N., Bestehorn, M., Dobler, G., Pfeffer, M., 2019. Repeated isolation of tick-borne encephalitis virus from adult *Dermacentor reticulatus* ticks in an endemic area in Germany. *Parasite Vector* 12, 90. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3346-6>.
- Cotté, V., Bonnet, S., Le Rhun, D., Le Naour, E., Chauvin, A., Boulouis, H.-J., Lecuelle, B., Liliin, T., Vayssier-Taussat, M., 2008. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1074–1080. <https://doi.org/10.3201/eid1407.071110>.
- Drehmann, M., Chitimia-Dobler, L., Lindau, A., Frank, A., Mai, S., Facht, K., Hauck, D., Knoll, S., Strube, C., Lühken, R., Fischer, D., Ziegler, L., Mackenstedt, U., 2019. *Ixodes frontalis*: a neglected but ubiquitous tick species in Germany. *Exp. Appl. Acarol.* 78, 79–91. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00375-3>.
- Estrada-Peña, A., Gray, J.S., Kahl, O., Lane, R.S., Nijhof, A.M., 2013. Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens—methodological principles and caveats. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 29. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00029>.
- Fattebert, J., Baubert, E., Slotow, R., Fischer, C., 2017. Landscape effects on wild boar home range size under contrasting harvest regimes in a human-dominated agro-ecosystem. *Eur. J. Wildl. Res.* 63, 32. <https://doi.org/10.1007/s10344-017-1090-9>.
- Filippova, N.A., 1997. In: *Arachnids IV*, T. (Ed.), Ixodid ticks of the subfamily Amblyomminae. (Fauna of Russia and neighbouring countries. Nauka, St. Petersburg issue 5, 436 p.
- Foissac, M., Socolovschi, C., Raoult, D., 2013. Les nouveautés sur le syndrome SENLAT : Scalp Eschar and Neck Lymphadenopathy after Tick bite. *Ann. Dermatol. Vener.* 140, 598–609. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2013.07.014>.
- Földvári, G., Rigó, K., Lakos, A., 2013. Transmission of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia raoultii* by male *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks to humans. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 76, 387–389. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.03.005>.
- Földvári, G., Siroký, P., Szekeres, S., Majoros, G., Sprong, H., 2016. *Dermacentor reticulatus*: A vector on the rise. *Parasite Vector* 9, 314. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1599-x>.
- Galfsky, D., Król, N., Pfeffer, M., Obiegala, A., 2019. Long-term trends of tick-borne pathogens in regard to small mammal and tick populations from Saxony, Germany. *Parasite Vector* 12, 131. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3382-2>.
- Gray, J.S., Estrada-Peña, A., Zintl, A., 2019. Vectors of Babesiosis. *Annu. Rev. Entomol.* 64, 149–165. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-111932>.
- Halos, L., Jamal, T., Maillard, R., Girard, B., Guillot, J., Chomel, B., Vayssier-Taussat, M., Boulouis, H.-J., 2004. Role of Hippoboscidae flies as potential vectors of *Bartonella* spp. infecting wild and domestic ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6302–6305. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6302-6305.2004>.
- Heylen, D., Coninck, E. de, Jansen, F., Madder, M., 2014. Differential diagnosis of three common Ixodes spp. ticks infesting songbirds of Western Europe: *Ixodes arboricola*, *I. frontalis* and *I. ricinus*. *Ticks Tick Borne Dis.* 5, 693–700. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.05.006>.
- Hornok, S., de la Fuente, J., Horváth, G., Fernández de Mera, I., Wijnveld, M., Tanczos, B., Farkas, R., Jongejan, F., 2012. Molecular evidence of *Ehrlichia canis* and *Rickettsia massiliae* in ixodid ticks of carnivores from South Hungary. *Acta Vet. Hung.* 61, 42–50. <https://doi.org/10.1556/avet.2012.050>.
- Jahfari, S., Fonville, M., Hengeveld, P., Reusken, C., Scholte, E.-J., Takken, W., Heyman, P., Medlock, J.M., Heylen, D., Kleve, J., Sprong, H., 2012. Prevalence of *Neohhrlichia mikurensis* in ticks and rodents from North-west Europe. *Parasite Vector* 5, 74. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-74>.
- Kahl, O., Bulling, I., Chitimia-Dobler, L., 2019. Questing *Ixodes frontalis* larvae in a forest close to Berlin (Germany) in November 2018. *Ticks Tick Borne Dis.* 10, 513.
- Kohn, M., Krücken, J., McKay-Demeler, J., Pachnicke, S., Krieger, K., von Samson-Himmelstjerna, G., 2019. *Dermacentor reticulatus* in Berlin/Brandenburg (Germany): Activity patterns and associated pathogens. *Ticks Tick Borne Dis.* 10, 191–206. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.10.003>.
- Krause, P.J., 2019. Human babesiosis. *Int. J. Parasitol.* 49, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.007>.
- Macaluso, K.R., Sonenshine, D.E., Ceraul, S.M., Azad, A.F., 2001. Infection and transovarial transmission of *Rickettsia* in *Dermacentor variabilis* ticks acquired by artificial feeding. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 45–53. <https://doi.org/10.1089/153036601750137660>.
- Maggi, R.G., Diniz, P.P., Cadenas, M.B., Breitschwerdt, E.B., 2006. The use of molecular diagnostic techniques to detect *Anaplasma*, *Bartonella* and *Ehrlichia* species in arthropods or patients. In: *The international canine vector-borne disease symposium*. Billesley, UK, pp. 9–14.
- Manelli, A., Torali, F., Pedri, P., Stefanelli, S., 1997. Spatial distribution and seasonality of ticks (Acarina: Ixodidae) in a protected area in the Northern Alps. *Parassitologia* 39, 41–45.
- Mangold, A.J., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 1998. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 84, 478–484. <https://doi.org/10.1007/s004360050433>.
- Merhej, V., Raoult, D., 2011. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol. Rev.* 86, 379–405. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00151.x>.
- Mierzejewska, E.J., Dwuznik, D., Bajer, A., 2018. Molecular study of transovarial transmission of *Babesia canis* in the *Dermacentor reticulatus* tick. *Ann. Agric. Environ. Med.* 25, 669–671. <https://doi.org/10.26444/aaem/94673>.
- Mierzejewska, E.J., Welc-Faleciak, R., Karbowski, G., Kowalek, M., Behnke, J.M., Bajer, A., 2015. Dominance of *Dermacentor reticulatus* over *Ixodes ricinus* (Ixodidae) on livestock, companion animals and wild ruminants in eastern and central Poland. *Exp. Appl. Acarol.* 66, 83–101. <https://doi.org/10.1007/s10493-015-9889-0>.
- Moore, T.C., Pulscher, L.A., Caddell, L., Fricken, M.E. von, Anderson, B.D., Gonchigoo, B., Gray, G.C., 2018. Evidence for transovarial transmission of tick-borne rickettsiae circulating in Northern Mongolia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006696. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006696>.
- Nosek, J., 1972. The ecology and public health importance of *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks in Central Europe. *Folia Parasitol.* 19, 93–102.
- Obiegala, A., Król, N., Oltersdorf, C., Nader, J., Pfeffer, M., 2017. The enzootic life-cycle of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) and tick-borne rickettsiae: an epidemiological study on wild-living small mammals and their ticks from Saxony, Germany. *Parasite Vector* 10, 115. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2053-4>.
- Obiegala, A., Oltersdorf, C., Silaghi, C., Kiefer, D., Kiefer, M., Woll, D., Pfeffer, M., 2016. *Rickettsia* spp. in small mammals and their parasitizing ectoparasites from Saxony, Germany. *Vet. Parasitol. Reg.* 5, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.08.008>.
- Obiegala, A., Pfeffer, M., Pfister, K., Karnath, C., Silaghi, C., 2015. Molecular examinations of *Babesia microti* in rodents and rodent-attached ticks from urban and sylvatic habitats in Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 6, 445–449. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.03.005>.
- Obiegala, A., Pfeffer, M., Pfister, K., Tiedemann, T., Thiel, C., Balling, A., Karnath, C., Woll, D., Silaghi, C., 2014. *Candidatus* Neohhrlichia mikurensis and *Anaplasma phagocytophilum*: prevalences and investigations on a new transmission path in small mammals and ixodid ticks. *Parasite Vector* 7, 563. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0563-x>.
- Obiegala, A., Silaghi, C., 2018. *Candidatus* Neohhrlichia mikurensis—recent insights and future perspectives on clinical cases, vectors, and reservoirs in Europe. *Curr. Clin. Microbiol. Rep.* 5, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0085-y>.
- Parola, P., Paddock, C.D., Socolovschi, C., Labruna, M.B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M.Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P.-E., Raoult, D., 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 657–702. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032.13>.
- Pfäffle, M., Littwin, N., Petney, T.N., 2015. Host preferences of immature *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae) in a forest habitat in Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 6, 508–515. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.04.003>.
- Portillo, A., Santibáñez, P., Palomar, A.M., Santibáñez, S., Oteo, J.A., 2018. *Candidatus* Neohhrlichia mikurensis in Europe. *New Microbes New Infect.* 22, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.12.011>.
- Prutsky, G., Domecq, J.P., Mori, L., Bebko, S., Matzumura, M., Sabouni, A., Shahrour, A., Erwin, P.J., Boyce, T.G., Montori, V.M., Malaga, G., Murad, M.H., 2013. Treatment outcomes of human bartonellosis: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* 17, e811–e819. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.02.016>.
- Roux, V., Raoult, D., 2000. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein OmpB (ompB). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1449–1455. <https://doi.org/10.1099/00207173-50-4-1449>.
- Rubel, F., Brugger, K., Monazahian, M., Habedank, B., Dautel, H., Leverenz, S., Kahl, O., 2014. The first German map of georeferenced ixodid tick locations. *Parasite Vector* 7, 477. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0477-7>.
- Růžek, D., Yakimenko, V.V., Karan, L.S., Tkachev, S.E., 2010. Omsk haemorrhagic fever. *The Lancet* 376, 2104–2113. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61120-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61120-8).
- Schaarschmidt, D., Gilli, U., Gottstein, B., Marreros, N., Kuhnert, P., Daepfen, J.A., Rosenberg, G., Hirt, D., Frey, C.F., 2013. Questing *Dermacentor reticulatus* harbouring *Babesia canis* DNA associated with outbreaks of canine babesiosis in the Swiss

- Midlands. *Ticks Tick Borne Dis.* 4, 334–340. <https://doi.org/10.1016/j.tbd.2013.01.007>.
- Silaghi, C., Pfeffer, M., Kiefer, D., Kiefer, M., Obiegala, A., 2016. *Bartonella*, rodents, fleas and ticks: a molecular field study on host-vector-pathogen associations in Saxony, Eastern Germany. *Microb. Ecol.* 72, 965–974. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0787-8>.
- Silaghi, C., Woll, D., Mahling, M., Pfister, K., Pfeffer, M., 2012. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in rodents in an area with sympatric existence of the hard ticks *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*, Germany. *Parasite Vector* 5, 285. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-285>.
- Špitalská, E., Stefanidesová, K., Kocianová, E., Boldiš, V., 2012. Rickettsia slovacica and Rickettsia raoultii in *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from Slovak Republic. *Exp. Appl. Acarol.* 57, 189–197. <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9539-8>.
- Széll, Z., Sréter-Lancz, Z., Márialigeti, K., Sréter, T., 2006. Temporal distribution of *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* in Hungary. *Vet. Parasitol.* 141, 377–379. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.06.008>.
- Tharme, A.P., 1993. Ecological studies on the tick *Dermacentor reticulatus* [Ph. D. thesis]. School of Biological Sciences, Gwynedd, University of Wales, pp. 4–5.
- Tsai, Y.-L., Chuang, S.-T., Chang, C.-C., Kass, P.H., Chomel, B.B., 2010. *Bartonella* species in small mammals and their ectoparasites in Taiwan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83, 917–923. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0083>.
- von Loewenich, F.D., Geissdörfer, W., Disqué, C., Matten, J., Schett, G., Sakka, S.G., Bogdan, C., 2010v. Detection of “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2630–2635. <https://doi.org/10.1128/JCM.00588-10>.
- Wójcik-Fatla, A., Bartosik, K., Buczek, A., Dutkiewicz, J., 2012. *Babesia microti* in adult *Dermacentor reticulatus* ticks from Eastern Poland. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12, 841–843. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0904>.
- Wójcik-Fatla, A., Cisak, E., Zając, V., Zwoliński, J., Dutkiewicz, J., 2011. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks collected from the Lublin region (eastern Poland). *Ticks Tick Borne Dis.* 2, 16–19. <https://doi.org/10.1016/j.tbd.2010.10.001>.
- Wójcik-Fatla, A., Zając, V., Sawczyn, A., Cisak, E., Dutkiewicz, J., 2015. *Babesia* spp. in questing ticks from eastern Poland: prevalence and species diversity. *Parasitol. Res.* 114, 3111–3116. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4529-5>.
- Wölfel, R., Essbauer, S., Dobler, G., 2008. Diagnostics of tick-borne rickettsioses in Germany: A modern concept for a neglected disease. *Int. J. Med. Microbiol. Suppl.* 298, 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.11.009>.
- Zahler, M., Gothe, R., 1995. Effect of temperature and humidity on egg hatch, moulting and longevity of larvae and nymphs of *Dermacentor reticulatus* (Ixodidae). *Appl. Parasitol.* 36, 53–65.