

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

**Untersuchungen zur Vektorkompetenz von Zecken für *Coxiella burnetii***

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

eingereicht von  
Sophia Körner  
aus Oschatz

Leipzig, 2021

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Martin Pfeffer

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

Prof. Dr. Silke Fischer, Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg, Stuttgart

Tag der Verteidigung: 21.09.2021

Weitere betreuende Einrichtungen:

Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen (IBIZ), Jena

Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI), Leipzig

## Inhaltsverzeichnis

### Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	<i>Coxiella burnetii</i>	3
2.1.1	Historischer Ursprung und taxonomische Einordnung	3
2.1.2	Morphologie und Replikation	3
2.1.3	<i>Coxiella burnetii</i> als Krankheitserreger	4
2.1.3.1	Epidemiologie	4
2.1.3.2	Coxiellen der Tiere	6
2.1.3.3	Q-Fieber des Menschen	6
2.1.3.4	Nachweis und Therapie	6
2.2	Zecken	7
2.2.1	Taxonomie	7
2.2.2	Verbreitung und Habitat	7
2.2.3	Morphologie	8
2.2.4	Lebenszyklus	9
2.2.5	Wirtssuche und sensorische Fähigkeiten	11
2.2.6	Blutmahlzeit und Verdauung	11
2.2.7	Zeckenmikrobiom und <i>Coxiella</i> -like Endosymbionten	12
2.2.8	Zecken als Vektoren	13
2.2.8.1	Infektionserreger	13
2.2.8.2	<i>Coxiella burnetii</i> in Zecken	14
2.3	Fütterung von Zecken	16
2.3.1	Fütterungssysteme	16
2.3.1.1	Membranbasierte Fütterungssysteme	17
2.3.1.2	Fixierungsstimuli im Zeckenfütterungssystem	18
2.3.1.3	Experimentelle Infektionen im membranbasierten <i>in-vitro</i> -System	18
3	Veröffentlichungen	20
3.1	Stellungnahme zum Eigenanteil an den Arbeiten zur Publikation	20
3.1.1	Publikation 1	21
3.2	Stellungnahme zum Eigenanteil an den Arbeiten zur Publikation	52
3.2.2	Publikation 2	53
4	Diskussion	64
5	Zusammenfassung	72
6	Summary	74
7	Literaturverzeichnis	76

## Inhaltsverzeichnis

8	Anhang	95
8.1	Bilder der Zeckenfütterung	95
9	Danksagung	97

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
A.	<i>Amblyomma</i>
Abb.	Abbildung
ACCM	Acidified cysteine-citrate medium
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C.	<i>Coxiella</i>
CCV	<i>Coxiella</i> -containing vacuole
CLE	<i>Coxiella</i> -like Endosymbionten
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
D.	<i>Dermacentor</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbant Assay
et al.	et alii; und andere
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
GE	Genomäquivalente
I.	<i>Ixodes</i>
IBIZ	Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IFT	Immunfluoreszenztest
IS1111	Insertionselement 1111
IZI	Institut für Zelltherapie und Immunologie
LCV	large cell variants
LPS	Lipopolysaccharid
PCR	Polymerasekettenreaktion
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RKI	Robert-Koch-Institut
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S	Svedberg
SCV	small cell variants
spp.	spezies pluralis
TKrMeldpflV	Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten
TSN	Tierseuchen-Nachrichtensystem
u.a.	unter anderem
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

*Coxiella burnetii* ist ein obligat intrazelluläres, unbewegliches und gram-negatives Bakterium, welches eine geringe Größe besitzt. Angepasst an eine Replikation unter den sauerstoffarmen und sauren Bedingungen des Phagolysosoms stellt *C. burnetii* einen Erreger dar, der über eine ausgeprägte Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen verfügt (SCHLIESSER 1991). Von großer Relevanz ist dieses Bakterium als Erreger der Krankheit Q-Fieber, die, erstmalig 1935 in Australien dokumentiert, als meldepflichtige Zoonose ein breites Spektrum an Tierarten sowie den Menschen betreffen kann (DERRICK 1937, MAURIN und RAOULT 1999). Das Hauptreservoir für die humane Infektion mit *C. burnetii* stellen domestizierte Wiederkäuer dar. Mit deren Milch, dem Urin und insbesondere während des Geburtsprozesses wird der Erreger in großen Mengen in die Umwelt freigesetzt (ARRICAU-BOUVERY et al. 2003). Die Infektion findet vorwiegend über die aerogene Aufnahme von kontaminierten Aerosolen statt, sodass Q-Fieber zumeist ein Risiko für tiernah arbeitende Personen, beispielsweise für Landwirte, Tierärzte und Schafscherer, darstellt (KARKI et al. 2015, GROTEN et al. 2020).

Neben der primären aerogenen Infektionsroute werden alternative Übertragungswege diskutiert, u.a. eine mögliche Infektion durch Vektoren und dabei im Besonderen durch Zecken. Diese sind innerhalb Europas die bedeutendsten Vektoren von Infektionserkrankungen für Mensch und Tier. Als obligat hämatophage Parasiten sind sie ubiquitär verbreitet und überwiegend wirtsunspezifisch. Die wichtigste Zeckenspezies in Mitteleuropa ist der Gemeine Holzbock, *Ixodes ricinus*, gefolgt von den Buntzeckenarten *Dermacentor reticulatus* und *Dermacentor marginatus* (RUBEL et al. 2014).

Eine der Erstisolierungen von *C. burnetii* gelang in den USA aus einer Zecke der Spezies *Dermacentor andersonii* durch DAVIS und COX (1938). In anschließenden Studien wurde *C. burnetii* mithilfe experimenteller Infektionen von Kleinsäugetieren und Nachweis mittels Färbetechniken in mehreren Zeckenspezies nachgewiesen und im Zuge dessen einzelnen Arten eine Vektorkompetenz bescheinigt (SMITH 1940, SMITH 1941, SMITH 1942, PHILIP 1948). LIEBISCH (1977) vermutete für die Schafzecke *D. marginatus* eine besondere Rolle in der Übertragung von Q-Fieber. Diese Auffassung beruht auf der Grundlage der räumlichen Korrelation des vermehrten Auftretens von Q-Fieber-Fällen und dieser Zeckenspezies.

Die Relevanz der Zecke als Überträger von Q-Fieber wird jedoch durch die neuere Literatur in Frage gestellt. Trotz regelmäßiger molekularer Nachweise von *C. burnetii*-DNA in Zecken existieren keine gesicherten Berichte über die Infektion von Menschen durch eine Zecke. Auch im Rahmen von Q-Fieber-Ausbrüchen konnte den Arthropoden bisher keine Beteiligung an der

Verbreitung der Erkrankung nachgewiesen werden (SPRONG et al. 2012). Zudem sind Zecken selbst Wirte eines diversen Mikrobioms, welches unter anderem auch Endosymbionten der Gattung *Coxiella* enthält (ZHONG 2012, MACHADO-FERREIA et al. 2016). Diese sind weit verbreitet und eng mit *C. burnetii* verwandt. Durch eine hohe genetische Gleichheit kommt es zu Überschneidungen in typischerweise zum molekularen Nachweis von *C. burnetii* verwendeten Zielgenen (DURON 2015, JOURDAIN et al. 2015). Dadurch entstand die Hypothese, dass aufgrund von Fehlinterpretationen von PCR-Ergebnissen die Prävalenz von *C. burnetii* in Zecken und damit deren Rolle in der Übertragung von Q-Fieber überbewertet wird (DURON et al. 2015b).

In den in Deutschland vorrangig vorkommenden Zeckenspezies wurde zwar bereits vereinzelt *C. burnetii* mit molekularen Methoden nachgewiesen, eine Vektorkompetenz für den Erreger wurde in bisherigen Studien jedoch nicht unter Laborbedingungen dargestellt (STING et al. 2004, HILDEBRANDT et al. 2011).

Die vorliegende Dissertationsschrift behandelt die Vektorkompetenz europäischer Zeckenspezies. Zunächst wurden innerhalb einer Literaturstudie Daten über das Vorkommen von *C. burnetii* in europäischen Zecken systematisch zusammengetragen und in Abhängigkeit verschiedener Faktoren, u.a. Detektions- und Sammelmethode, Land und Zeckenspezies, analysiert. Im Weiteren wurde mithilfe eines artifiziellen, membranbasierten Fütterungssystems untersucht, inwieweit Zecken der in Deutschland beheimateten Arten *I. ricinus* und *D. marginatus* den Erreger *C. burnetii* aus dem Blut aufnehmen und ausscheiden. Zudem wurde die transstadiale Übertragung von *C. burnetii* von infizierten Nymphen zu Adulten der Spezies *I. ricinus* getestet. Fortführend wurden auch diese transstadial infizierten Weibchen mit sterilem Blut gefüttert, um deren Ausscheidungsprodukte auf *C. burnetii* zu untersuchen und ferner mittels Detektion im Blut eine mögliche Übertragung mit dem Zeckenstich zu überprüfen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 *Coxiella burnetii*

#### 2.1.1 Historischer Ursprung und taxonomische Einordnung

Die ersten bekannten Infektionen mit *Coxiella burnetii* wurden 1935 in Australien bei Schlachthofmitarbeitern beschrieben und aufgrund der zunächst unklaren Herkunft der fiebrigen Symptomatik vom Pathologen Edward Holbrook DERRICK (1937) als „query fever“ – Bezug nehmend auf den fraglichen Ursprung der Symptome – bezeichnet. Der ursächliche Erreger konnte in den anschließenden Jahren durch zwei Arbeitsgruppen von Macfarlane BURNET und Mavis FREEMAN (1937) in Australien sowie Gordon DAVIS und Herald Rea COX (1938) in den USA isoliert werden. Der Erreger wurde zunächst als *Rickettsia burnetii* bzw. *Rickettsia diporica* bezeichnet und ab 1948 in *Coxiella burnetii* umbenannt (PHILLIP 1948). Nach seiner Entdeckung wurde der Erreger zunächst zu den *Rickettsiales* gezählt. Seit den 90er Jahren wird er jedoch aufgrund der Ergebnisse aus 16S rRNA-Analysen mit seiner eigenen Familie *Coxiellaceae* in die Ordnung der *Legionellales* der Klasse Gammaproteobacteria verortet, wobei *Legionella* spp. die nächsten Verwandten darstellen (WEISBURG et al. 1989, STEIN et al. 1993).

#### 2.1.2 Morphologie und Replikation

*C. burnetii* ist circa 0,2 - 0,45 µm breit und bis 2 µm lang. Somit ist das Bakterium durch Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtrierbar, wobei jedoch nur ein Teil der Erreger Filterporen von < 0,7 µm passieren kann (BURNET und FREEMAN 1937). *C. burnetii* ist ein obligat intrazelluläres und gram-negatives Bakterium, das in der äußeren Membran eine Schicht Lipopolysaccharide (LPS) besitzt. Dieses ist der einzige bekannte Virulenzfaktor von *C. burnetii* und dient unter anderem der Behinderung des Phagozytoseprozesses (ABNAVE et al. 2017). Das LPS kann in zwei verschiedenen Formen auftreten, wobei die Phase I mit einem voll synthetisierten, glatten LPS hochvirulent ist und im immuninkompetenten Wirt vorkommt, während das LPS der Phase II-Erreger unvollständig vorhanden ist. Zur Phasenvariation der Coxiellen kommt es durch wiederholtes Passagieren der Erreger in Zellkultur oder embryonierten Hühnereiern (STOKER und FISET 1956, HACKSTADT et al. 1985). Dies geht mit einem Verlust der Virulenz einher (SHANNON et al. 2005). Der Stamm Nine Mile Phase II löst ausschließlich in immuninkompetenten Wirten Erkrankungssymptome aus und kann daher im Labor unter Bedingungen der biologischen Schutzstufe 2 gehandhabt werden (SAMUEL und HENDRIX 2009, ISLAM et al. 2013).

Eintrittspforte für *C. burnetii* ist häufig die Lunge, dabei sind überwiegend Alveolarmakrophagen die ersten betroffenen Zellen (KHAVKIN und TABIBZADEH 1988). Als einzigem bekannten Pathogen ist es *C. burnetii* möglich, sich unter den sauren Bedingungen Phagosomen-ähnlicher Vakuolen zu replizieren. Dabei stellt ein pH-Wert von ca. 4,5-5,0 die optimale Bedingung für den Metabolismus von *C. burnetii* dar (HACKSTADT und WILLIAMS 1981). Zunächst werden die Bakterien passiv in die Zelle aufgenommen. Nach der Fusion des Phagosoms mit dem Lysosom halten sich die Erreger anschließend in der so gebildeten parasitophoren Vakuole, auch *Coxiella*-containing vacuole (CCV) genannt, auf (HECHEMY et al. 1993, GRAHAM et al. 2013). In dieser CCV differenzieren sie sich zu sogenannten Large Cell Variants (LCV) aus, welche die replikative Form der Coxiellen darstellen, bis 2 µm groß sein können und eine pleomorphe Gestalt aufweisen (COLEMAN et al. 2004). Anschließend entwickeln sich sogenannte Small Cell Variants (SCV), welche Ähnlichkeiten mit Sporen aufweisen, eine hohe Tenazität besitzen und daher über Monate bis Jahre in der Umwelt infektiös bleiben können (MCCAUL und WILLIAMS 1981). Diese SCV sind stäbchenförmig, etwa 0,2 x 0,45 µm groß und zeichnen sich durch ein stark kondensiertes Chromatin aus.

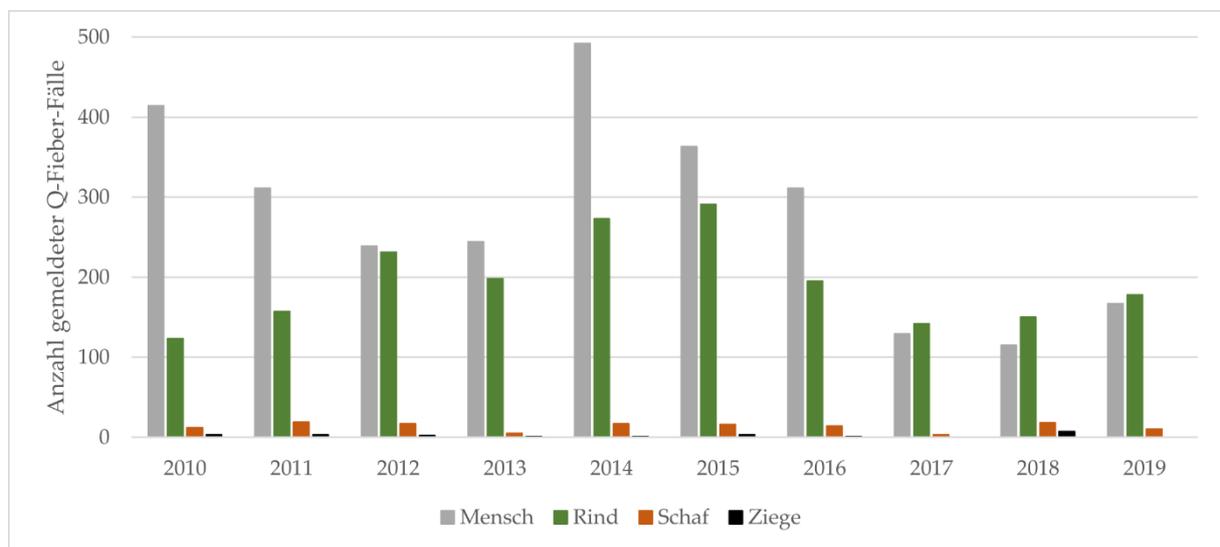
### **2.1.3 *Coxiella burnetii* als Krankheitserreger**

#### **2.1.3.1 Epidemiologie**

*C. burnetii* weist ein großes Wirtsspektrum auf und kann in verschiedensten Säugetieren sowie Vögeln nachgewiesen werden, wobei die meisten menschlichen Infektionen auf Hauswiederkäuer zurückzuführen sind (ARRICAU-BOUVERY und RODOLAKIS 2005, ANGELAKIS und RAOULT 2010). Die aerogene Transmission ist der Hauptübertragungsweg von *C. burnetii*. Aerosole werden durch kontaminierte Stäube gebildet, wobei der Geburtsprozess ein hohes Risiko darstellt, da Nachgeburt sowie Fruchtwasser große Mengen an Erregermaterial enthalten können (VAN DEN BROM et al. 2015). Das Eintrocknen dieser Materialien kann begünstigen, dass andere Tiere oder Menschen infiziert werden. Auch die Witterungsbedingungen, insbesondere Wind, können einen Eintrag von *C. burnetii* in das Umfeld von Tierställen begünstigen (TISSOT-DUPONT et al. 2004). Weiterhin wird *C. burnetii* auch über die Milch ausgeschieden und stellt deren hitzeresistentesten Erreger dar (HUEBNER und JELLISON 1949). Durch die in Deutschland vorgeschriebene Pasteurisierung, welche den Erreger sicher abtötet, ist eine orale Übertragung jedoch nur bei Rohmilchverzehr möglich und damit vergleichsweise unwahrscheinlich (GALE et al. 2015). In seltenen Fällen wird Q-Fieber auf dem artifiziellen Wege übertragen, beispielsweise durch Transfusionen oder Lebendzelltherapien (ROBYN et al.

2015). Auch die Zecke wird in der Literatur als potenzieller Überträger von *C. burnetii* angesehen, wie im Folgenden näher ausgeführt wird (vgl. 2.2.8.2).

*C. burnetii* ist, mit Ausnahme von Neuseeland und der Antarktis, weltweit verbreitet (GREENSLADE et al. 2003, PEXARA et al. 2018). Während des zweiten Weltkrieges traten erste Q-Fieber-Fälle in Europa auf. Im Laufe der letzten Hälfte des 20. Jahrhunderts konnte innerhalb Deutschlands eine Zunahme an Q-Fieber-Fällen beobachtet werden. Zwischen 2007 und 2010 kam es in den Niederlanden zum bisher größten bekannten Q-Fieber-Ausbruch weltweit, bei welchem über 4000 Menschen infiziert wurden und die chronischen Folgen weiterhin anhalten (MORROY et al. 2016, DE LANGE et al. 2019).



**Abbildung 1:** Q-Fieberfälle in Deutschland, erstellt nach Meldedaten des RKI (02.12.2020) und TSN (29.05.2020).

Der Nachweis von *C. burnetii* im Menschen ist nach Infektionsschutzgesetz meldepflichtig, ebenso das Auftreten der Coxiellose im Tier nach Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten (Abb. 1) (ANON. 2000, ANON. 2011). In Deutschland tritt Q-Fieber beim Menschen am häufigsten während des Frühjahrs und über Gesamtdeutschland verteilt auf, wobei in Baden-Württemberg leicht höhere Fallzahlen gemeldet werden (RKI 2016). Auffallend ist eine regelmäßige Häufung von Fällen im Rahmen von Q-Fieber-Ausbrüchen, wie zum Beispiel im Jahr 2003 in Soest oder 2005 in Jena. Letzterer ging vordergründig von infizierten Schafherden während der Lammung aus. BODEN et al. (2014) konnten dabei feststellen, dass ein Öffnen der Fenster zu einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit führte, sofern diese den Herden zugewandt waren. HELLENBRAND et al. (2001) mutmaßten, dass die Ursachen vermehrter Ausbrüche in der Verstädterung des ländlichen Raums liegen, wodurch bei Tierkontakt eine höhere Anzahl von Menschen betroffen ist.

### **2.1.3.2 Coxiellosen der Tiere**

Hauswiederkäuer stellen das wichtigste Reservoir für die menschliche Infektion dar. Eine Infektion mit *C. burnetii* verläuft bei Schafen, Ziegen und Rindern überwiegend symptomlos. Eine Bestandsinfektion wird in Landwirtschaftsbetrieben gelegentlich durch eine verlängerte Zwischenkalbezeit und erhöhte Früh- und Totgeburtenszahl deutlich (GACHE et al. 2017). In seltenen Fällen kann eine chronische Endometritis beobachtet werden (DE BIASE et al. 2018). Weiterhin ist *C. burnetii* eine mögliche Ursache subklinischer Mastitiden (BARLOW et al. 2008). Durch den überwiegend asymptomatischen Verlauf wird eine Ursachensuche häufig erst betrieben, wenn Menschen an dieser Zoonose erkranken (CUTLER et al. 2007).

### **2.1.3.3 Q-Fieber des Menschen**

Infizierte Menschen zeigen im akuten Krankheitsfall überwiegend eine fieberhafte, grippale Symptomatik, wobei kompliziertere Krankheitsverläufe mit Pneumonie oder Hepatitis einhergehen können (PANJWANI et al. 2015, JANG et al. 2017). Bei einer Chronifizierung bilden sich überwiegend Endokarditiden aus, dabei stellen Patienten mit einer Erkrankung der Herzklappen eine Risikogruppe dar (MAURIN und RAOULT 1999). In der Schwangerschaft kann eine Q-Fieber-Infektion das Auftreten von Fehl- und Totgeburten begünstigen (NIELSEN et al. 2014). Während die Mortalität bei akuten Verläufen gering ist, konnten KAMPSCHREUR et al. (2014) in Fällen von chronisch an Q-Fieber erkrankten Patienten eine Letalität von 13 % innerhalb von fünf Jahren nach der Infektion nachweisen.

### **2.1.3.4 Nachweis und Therapie**

Für die labormedizinisch bestätigte Diagnose sind serologische Untersuchungen angezeigt. Dabei stehen verschiedene zugelassene Testsysteme, überwiegend auf IFT oder auf ELISA-Prinzipien basierend, zur Verfügung. Weiterhin kann aus Organmaterial, Milch oder Genitaltupfern eine Anzucht der Erreger oder ein Antigen-Nachweis mittels PCR (vgl. 2.2.8.2) durchgeführt werden. Während die Kultivierung von *C. burnetii* im letzten Jahrhundert ausschließlich in embryonierten Hühnereiern oder später in Zellkultur erfolgen konnte, war durch die Entwicklung eines angesäuerten Citrat-Cystein-Mediums (ACCM) erstmals auch die Isolation von *C. burnetii* in zellfreiem, axenischem Medium möglich (OMSLAND et al. 2008, BODEN et al. 2015). Die Isolation des Erregers ist jedoch sehr aufwändig und dadurch in der Routinediagnostik nicht gebräuchlich. Therapeutisch lässt sich eine Q-Fieber-Infektion im akuten Fall erfolgreich mittels Doxycyclin oder anderen Tetracycline behandeln, in chronischen Fällen ist jedoch eine antibiotische Behandlung über mehrere Jahre indiziert (VAN ROEDEN et al. 2018).

## 2.2 Zecken

### 2.2.1 Taxonomie

Zecken gehören zur Klasse der Spinnentiere (Arachnidae), wobei die Milben (Acaridae) deren veterinär- und humanmedizinisch bedeutendste Unterklasse darstellen. Innerhalb deren Ordnung der Zecken lassen sich drei Familien abgrenzen: Argasidae (Lederzecken), Ixodidae (Schildzecken) und Nuttallillidae.

In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf Schildzecken (Ixodidae) welche die in Europa bedeutendsten Vektoren, insbesondere für Lyme-Borreliose und die Frühsommer-Meningoenzephalitis, darstellen (VALARCHER et al. 2015, STEERE et al. 2016). Diese Familie besteht aus über 690 verschiedenen Spezies, aufgeteilt in 12 Gattungen (SONENSHINE und ROE 2014). In Europa sind die Gattungen *Ixodes*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Haemaphysalis* und *Rhipicephalus* verbreitet. Äußerliche gemeinsame Eigenschaften sind das deutlich ausgeprägte Schild sowie das im Unterschied zu Lederzecken rostral befindliche Capitulum (ESTRADA-PEÑA 2015). Die meisten in Deutschland vorkommenden Schildzecken sind exophile Lauerjäger und lassen sich durch ihre Wirte von Gräsern und Gebüsch abstreifen (GRAY et al. 2016). In den folgenden Abschnitten wird insbesondere auf die Eigenschaften der für den experimentellen Teil dieser Arbeit relevanten Spezies *Ixodes ricinus* und *Dermacentor marginatus* eingegangen.

### 2.2.2 Verbreitung und Habitat

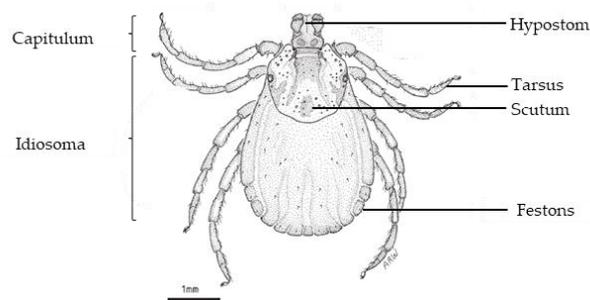
In Deutschland ist *Ixodes ricinus*, der Gemeine Holzbock, die am häufigsten verbreitete Schildzecken-Art und wird im gesamten Bundesgebiet nachgewiesen (RUBEL et al. 2014). *I. ricinus* kommen in ganz Europa und vereinzelt auch in Nordafrika und dem Nahen Osten vor (ALKISHE et al. 2017). Das bevorzugte Habitat Gemeiner Holzböcke sind Feuchtwiesen und Mischwälder der gemäßigten Klimazone, wo ihre optimale Luftfeuchtigkeit von über 85 % erreicht wird (SCHULZ et al. 2014, BOEHNKE et al. 2015). In urbanen Gegenden hingegen sind Schildzecken deutlich seltener anzutreffen (KUBIAK und DZIEKOŃSKA-RYNKO 2006). Für die Wirtssuche entfernen sich die Zecken aus den Feuchtbereichen und können als Adulte über mehrere Tage eine niedrigere Luftfeuchtigkeit tolerieren (PERRET et al. 2003). Dennoch ist eine regelmäßige Rückkehr zu feuchteren Gebieten, beispielsweise am Waldboden, nötig, um das Suchverhalten aufrechtzuerhalten (ESTRADA-PEÑA 2015). Die optimale Temperatur für die Entwicklung dieser Zeckenart liegt zwischen 20 und 28 °C. *I. ricinus* können jedoch durch ihr geringes Körpervolumen auch niedrige Temperaturen bis ca. -18 °C tolerieren, wodurch sie

in Mitteleuropa milde Winter überstehen können (DAUTEL und KNÜLLE 1996, DAUTEL 2010).

*Dermacentor marginatus* ist eine thermophile Zecke, die innerhalb Deutschlands insbesondere in den Rhein-Main-Auen vorkommt (LIEBISCH und RAHMAN 1976, RUBEL et al. 2016). In neueren Untersuchungen konnte eine Ausbreitung dieser Spezies Richtung Norden festgestellt werden, was auf verschiedene Faktoren, z.B. den Klimawandel und die vermehrte Verfügbarkeit von Wildtieren als Wirte zurückgeführt wird (FÖLDVÁRI et al. 2016, WALTER et al. 2016, DREHMANN et al. 2020). Juvenile *D. marginatus* sind wenig kälteresistent; insbesondere im Larvenstadium wurden Temperaturen unter 10 °C unter Laborbedingungen nur über einen kurzen Zeitraum toleriert (DÖRR und GOTHE 2001). MAGDAŞ et al. (2015) stellten einen signifikant kürzeren Entwicklungszyklus bei einer Haltung der Zecken bei 27 °C im Vergleich zu einer Haltung bei 21 °C fest.

### 2.2.3 Morphologie

Erkennbar sind *I. ricinus* Weibchen an einem schwarzen Schild, dem Scutum, welches sich über das erste Drittel des nicht vollgesogenen Idiosomas erstreckt (Abb. 2). Der unsklerotisierte Teil des Körpers weist eine rotbraune Färbung auf. Weibchen sind im ungesogenen Zustand etwa 3-4 mm lang und können nach erfolgter Blutaufnahme eine Größe von bis zu 1,5 cm erreichen. *I. ricinus* zeigen einen deutlichen Geschlechtsdimorphismus, sodass die Männchen dieser Art erheblich kleiner und ihr Idiosoma vollständig von ihrem schwarzen Schild bedeckt ist.



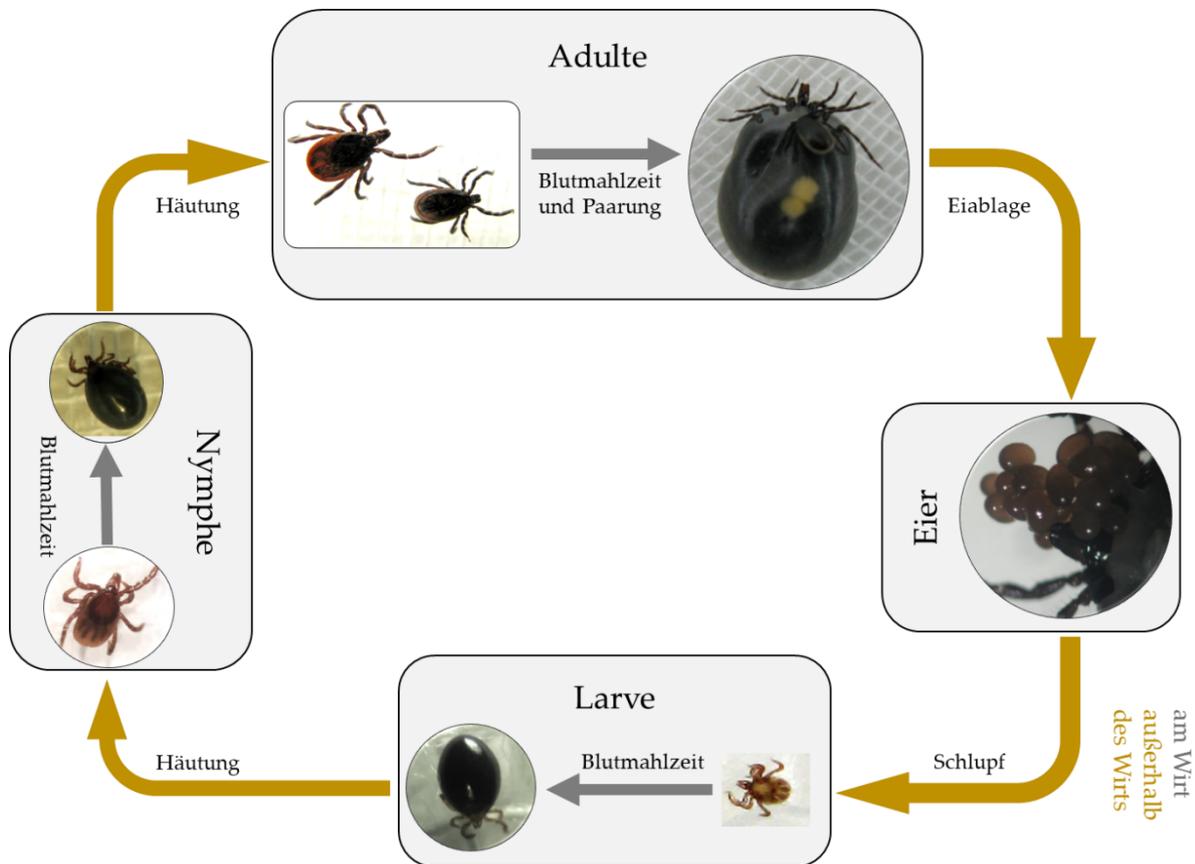
**Abbildung 2:** oben - Schematische Darstellung der Morphologie einer weiblichen *D. marginatus*, Bild aus WALKER et al. (2003), unten - *I. ricinus* Weibchen (links), *D. marginatus* Weibchen (rechts). Fotografien Makert/Körner © Fraunhofer IZI

Das Scutum der *D. marginatus* ist, entsprechend dem deutschen Gattungsnamen Buntzecke, schwarz-weiß marmoriert. Diese Zeckenspezies ist mit ca. 5 mm deutlich größer als *I. ricinus*, wobei zwischen Männchen und Weibchen kaum ein Größenunterschied besteht. Am Rande des Scutums befinden sich Augen. Der Abschluss des Idiosomas weist Einkerbungen auf, welche Festons genannt werden.

#### 2.2.4 Lebenszyklus

Es handelt sich sowohl bei *I. ricinus* als auch bei *D. marginatus* um dreiwirtige Zecken, welche in jedem Lebensstadium an einem neuen Wirt Blut aufnehmen (Abb. 3). Adulte weibliche *I. ricinus* sind über etwa 7-12 Tage an einem Wirt fixiert, bis sie sich vollgesogen haben und abfallen (LEES 1948). Nach einiger Zeit, FALKE (1931) beobachtete einen Zeitraum von 8-10 Tagen, findet die Eiablage statt, wobei das Weibchen mehrere hundert bis mehrere tausend Eier legt (HONZÁKOVÁ et al. 1975). Anschließend verstirbt das Weibchen noch vor dem Schlupf der sechsbeinigen Larven nach etwa 40 Tagen (FALKE 1931). Diese gehen nach dem Aushärten der Cuticula auf Wirtssuche, wobei sie vorwiegend Mäuse oder Ratten befallen, jedoch können Larven auch an den Beinen größerer Säuger gefunden werden (MYSTERUD et al. 2014). Nach ihrer etwa 3-4 Tage andauernden Blutmahlzeit häutet sich die Larve zu einer achtbeinigen Nymphe, die von den adulten Weibchen neben der geringen Größe und der grauen Färbung anhand der weniger ausgeprägten Genitalöffnung unterscheidbar ist (LEES 1948). Auch in diesem Stadium erfolgt eine Blutmahlzeit, bei der innerhalb von 3-5 Tagen an einem Wirt, häufig an Kleinsäugetieren, Blut aufgenommen wird (LEES 1948, LIU et al. 2014). Zecken in diesem Stadium reagieren am stärksten auf Stimuli des menschlichen Wirtes und sind daher auch am häufigsten an der Übertragung von Pathogenen beteiligt (VASSALLO und PÉREZ-EID 2002). Nach ca. 60 Tagen (FALKE 1931) erfolgt die Häutung zu den adulten Zecken und damit auch die Geschlechtsdifferenzierung in Männchen und Weibchen, wobei Männchen dieser Art nur gelegentlich für kurze Zeit Blut aufnehmen, da ihre Spermiogenese unabhängig von der Blutaufnahme vonstattengeht (KISZEWSKI et al. 2001). Die Paarung findet, anders als bei den meisten Schildzecken-Arten, nicht nur auf dem Wirt, sondern auch vor und nach der Blutaufnahme der Weibchen statt, wobei die Männchen nach der Begattung mehrerer Weibchen versterben. Die Befruchtung durch ein Männchen auf dem Wirt ist dabei für die weibliche

adulte Zecke der Auslöser für die letzte Phase der schnellen Blutaufnahme. Der gesamte Lebenszyklus von *I. ricinus* kann, je nach Klimabedingungen und Verfügbarkeit von Wirten, bis zu sechs Jahre betragen (WILSON und ELSTON 2018); gewöhnlich wird eine Lebensdauer von 2,5-4 Jahren beobachtet (GARDINER und GETTINBY 1983).



**Abbildung 3:** Lebenszyklus von *Ixodes ricinus*. Fotografien Makert/Körner © Fraunhofer IZI

Die Saugdauer adulter *D. marginatus* Weibchen beträgt unter Laborbedingungen zwischen 5 und 11 Tagen bei Fütterung an Nagern und Kaninchen, wobei die Begattung durch das Männchen auf dem Wirt stattfindet (NOSEK et al. 1967, MAGDAŞ et al. 2015). Nach dem Larvenschlupf nach ca. einem Monat saugen die entwickelten Larven für 2-7 Tage (DARVISHI et al. 2014, MAGDAŞ et al. 2015). Nymphen saugen nach einem weiteren Monat für 3-11 Tage an einem weiteren Wirt und häuten sich nach 12-25 Tagen zu adulten Zecken (NOSEK et al. 1967, DARVISHI et al. 2014, MAGDAŞ et al. 2015). Insgesamt dauert ein Entwicklungszyklus von *D. marginatus* unter Laborbedingungen 83 bis 163 Tage und kann auch in der Natur unter günstigen Bedingungen innerhalb eines Jahres vonstattengehen (NOSEK et al. 1967, JANISCH und FARKAS 1984, WALTER et al. 2016).

### 2.2.5 Wirtssuche und sensorische Fähigkeiten

Die sensorischen Fähigkeiten von Schildzecken sind auf das Auffinden eines Wirts ausgerichtet. Mechano- und Chemorezeptoren befinden sich, als Härchen sichtbar, auf der Oberfläche der Zecke (MCIVER 1975). Ein weiteres wichtiges Sinnesorgan der Schildzecken ist das Haller'sche Organ, welches am Tarsus des ersten Beinpaars der Zecken zur Wahrnehmung verschiedener chemischer Verbindungen dient (FOELIX und AXTELL 1972). Hier wird außerdem die Anwesenheit von Kohlenstoffdioxid als Zeichen für die Nähe eines potentiellen Wirtes und damit als Aktivator registriert (VAN DUIJVENDIJK et al. 2017). *I. ricinus* besitzen im Gegensatz zu *D. marginatus* keine Augen, jedoch wurden Photorezeptorzellen beschrieben, die es ihnen möglich machen, Helligkeit und Dunkelheit wahrzunehmen (PERRET et al. 2003). Für *I. ricinus* Adulti wird häufig eine bimodale Aktivität beschrieben, deren Höhepunkte sich im späten Frühjahr sowie im Herbst befinden (CAYOL et al. 2017), während in anderen Studien eine unimodale Hauptaktivität im Frühjahr ermittelt wurde (SCHULZ et al. 2014; ASGHAR et al. 2016). Tageszeitlich scheinen die Suchaktivitäten sowohl vom Licht als auch von der Aktivität der Wirte abhängig zu sein (ZÖLDI et al. 2013).

Hauptaktivitätszeitraum von *D. marginatus* ist im Frühjahr (DREHMANN et al. 2020). Juvenile *Dermacentor* spp. lauern, anders als Vertreter der *Ixodes* spp., nicht, sondern pflegen eine endophile Lebensweise, bei der sie an Kleinsäuger in deren Nestern parasitieren (DWUŽNIK et al. 2019). Ursprünglich wurde das Schaf als Hauptwirt adulter *D. marginatus* festgestellt, die Zecken wurden jedoch auch auf über 13 weiteren heimischen Haus- und Wildsäugetierarten sowie Vogelarten beobachtet (LIEBISCH und RAHMAN, 1976, RUBEL et al. 2016, WALTER et al. 2016).

### 2.2.6 Blutmahlzeit und Verdauung

Anders als Lederzecken, die mehrmalig an ihrem Wirt saugen, saugen Schildzecken nur je einmal in jedem Lebensstadium. Dabei wird, besonders von adulten Weibchen, das Blut nicht kontinuierlich, sondern je nach Phase der Fixation in unterschiedlicher Geschwindigkeit aufgenommen. In den ersten 24-36 Stunden fixieren sich die Weibchen am Wirt, wobei in dieser Phase wenig oder noch kein Blut aufgenommen wird. Die Blutaufnahme der Zecken erfolgt über die Mundwerkzeuge. Dabei wird mittels der Chelizeren mit Haken die Haut des Wirts leicht aufgeritzt. Anschließend dient das bezahnte Hypostom als Verankerung im Wirt (RICHTER et al. 2013). Zunächst erfolgt eine Phase der langsamen Blutaufnahme und Verdauung im Darm der Arthropoden. Überschüssige Blutbestandteile werden im Rektalsack gesammelt und

über die Analöffnung als Zeckenkot ausgeschieden. Das übrige Wasser wird als Speichel wieder in den Wirt abgegeben (SAUER et al. 1995). Das größte Blutvolumen wird vor allem in den letzten 24 Stunden der Blutmahlzeit aufgenommen. Hier erfolgt eine starke Volumenzunahme, in der das durch Speichelproduktion eingedickte Blut eingelagert wird. In dieser Phase dehnt sich das Weibchen bis auf über 1,5 cm Länge aus, was durch das Wachstum der Cuticula erreicht werden kann (ANDERSEN und ROEPSTORFF 2005). Nach dem Abfallen des Weibchens vom Wirt wird das Blut verdaut und die Nährstoffe in die Reifung der Oozyten investiert (SOJKA et al. 2013). Der Zeckendarm besteht aus drei Abschnitten, wobei der Mitteldarm den für die Verdauung wichtigsten darstellt. Dieser besteht aus vielen blind endenden Ausstülpungen. Im Darm werden die Blutbestandteile, insbesondere das Hämoglobin, durch Endozytose in die Mitteldarmzellen aufgenommen, wobei außer durch wenige Proteasen keine vorherige enzymatische Verdauung im Lumen stattfindet (SOJKA et al. 2013). Die zelluläre Zusammensetzung des Darmepithels variiert dabei entsprechend der unterschiedlichen Saugphasen (FRANTA et al. 2010). Intrazellulär wird die Blutmahlzeit unter sauren Bedingungen verdaut. Die proteolytische Aktivität erreicht dabei bei *Rhipicephalus microplus* ihr Optimum bei einem pH-Wert von 3-4, wobei Cathepsine die wichtigsten Enzyme darstellen (MENDIOLA et al. 1996, HORN et al. 2009).

### **2.2.7 Zeckenmikrobiom und *Coxiella*-like Endosymbionten**

Zecken sind selbst Wirte eines vielfältigen Mikrobioms, dessen Erforschung in den letzten Jahren durch moderne molekularbiologische Methoden wie Next-Generation-Sequencing beschleunigt wurde (KARIM et al. 2017, COUPER und SWEI 2018, CHICANA et al. 2019). Nach derzeitigem Wissen wird davon ausgegangen, dass nur ein Bruchteil der Bakterien, die Zecken besiedeln, tatsächlich als pathogene Erreger fungieren können. Vielmehr enthüllt sich eine Symbiose zwischen einzelnen Bakterien und Zecken. Dass sich eine Fütterung von Zecken auf antibiotikabehandelten Tieren negativ auf die Zeckenvitalität und ihre Reproduktionsfähigkeit auswirkt, wurde durch LI et al. (2018a) anhand von *Rhipicephalus haemophysaloides* und durch BEN-YOSEF et al. (2020) anhand von *Rhipicephalus sanguineus* experimentell erwiesen. Die Zusammensetzung der Mikroflora im Mitteldarm richtet sich vorwiegend nach der Region und Umgebung der Zecke und damit nach der Vegetation (XU et al. 2015). In bisherigen Untersuchungen wurden vorwiegend Bakterien der Klasse Alphaproteobacteria, insbesondere die Spezies *Candidatus* Midichloria als Endosymbiont detektiert (CERUTTI et al. 2018). Endosymbionten scheinen sich schnell zwischen verschiedenen Arthropoden zu übertragen, so dass die Prävalenzen einiger dieser Symbionten hoch sind (DURON und HURST 2013). Eine bedeutende Gruppe bilden *Coxiella*-like-Endosymbionten (CLE). Diese sind in verschiedenen

Schildzecken-Arten weit verbreitet und gelten weitestgehend als apathogen, wobei *Candidatus Coxiella massiliensis* eine Beteiligung an Wundheilungsstörungen nach Zeckenstichen nachgesagt wird und Berichte über Todesfälle durch CLE-infizierte Vögel existieren (ANGELAKIS et al. 2016, FLANDERS et al. 2017). CLE dienen als Bereitsteller von Vitamin B, welches für hämatophage Arthropoden essenziell ist (SMITH et al. 2015). Für *Rhipicephalus microplus* scheinen CLE eine bedeutende Rolle in der Entwicklung der Zecke zu spielen, wobei in einer Studie von GUIZZO et al. (2017) mit Tetrazyklin behandelte Zecken nicht in der Lage waren, sich vollständig weiterzuentwickeln. Auch für *Amblyomma americanum* wird eine solche Symbiose vermutet, da CLE in hoher Prävalenz in ihnen nachgewiesen werden konnten (JASINSKAS et al. 2007). Diese Endosymbionten konnten neben dem Darm vor allem in der Speicheldrüse sowie den Ovarien der Spezies *A. americanum* und in den Ovarien und Malpighi-Tubuli von *D. marginatus* visualisiert werden (KLYACHKO et al. 2007, BUYSSE et al. 2019). In einer Studie von DURON et al. (2017) gelang in über der Hälfte der untersuchten Zecken ein Nachweis von CLE, wobei einige dieser Endosymbionten eng an einzelne Zeckenspezies gebunden zu sein scheinen, während andere ihre Wirte häufiger wechseln. Auch *C. burnetii* scheint seinen phylogenetischen Ursprung in jenen Endosymbionten von Lederzecken zu haben, wobei neueste Studien zu dem Ergebnis kamen, dass der Vorfahre einzelner Vertreter der CLE die Fähigkeit besessen haben muss, Immunzellen zu infizieren (DURON et al. 2015a, BRENNER et al. 2020). Die Bedeutung von Endosymbionten ist entscheidend für die Lebensweise der Zecken selbst, aber auch für die Interaktion mit zeckenübertragenen Krankheitserregern (BONNET et al. 2017). Dass eine Co-Infektion von Endosymbionten und Erregern einen Einfluss auf die Entwicklung der Erreger im Wirt haben kann, wurde für *Rickettsia rickettsii* und den Symbionten *Rickettsia amblyomma* in der Zecke *A. americanum* bewiesen (LEVIN et al. 2018). Dabei stellte sich sowohl die transstadiale als auch die transovariale Übertragung des Rocky-Mountain-Fleckfieber-Erregers in der Endosymbionten-infizierten Kohorte als vermindert dar. LI et al. (2018b) zeigten eine Korrelation zwischen einer erniedrigten Infektionsrate von *Rhipicephalus haemaphysaloides* mit CLE und einer geringeren transstadialen Übertragung von *Babesia microti*.

## **2.2.8 Zecken als Vektoren**

### **2.2.8.1 Infektionserreger**

*I. ricinus* sind potente Überträger verschiedener Infektionskrankheiten. In Deutschland spielen dabei die Lyme-Borreliose und die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) die größte

Rolle. Auch die Übertragung weiterer Erreger, u.a. *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp., *Bartonella henselae* und *Babesia* spp., ist in Deutschland durch *I. ricinus* möglich (VON WISSMANN et al. 2015, SILAGHI et al. 2016, BLAZEJAK et al. 2017, KAUFFMANN et al. 2017). *Dermacentor* spp. scheinen in der Übertragung der Borreliose eine geringe Rolle zu spielen (EISEN et al. 2020). Es gibt molekulare Nachweise von *Rickettsia* spp. oder *Theileria* spp. infizierten *D. marginatus*, über die konkrete Vektorkompetenz dieser Spezies liegen jedoch kaum Erkenntnisse vor (CHISU et al. 2019, PASCUCCI et al. 2019). Eine Infektion der Zecke erfolgt durch das Saugen an einem infizierten und virämischen bzw. bakteriämischen Wirt. Eine Übertragung ist auch durch das gleichzeitige, räumlich nahe Saugen von Zecken mit unterschiedlichem Infektionsstatus möglich. Dabei wird vom Co-Feeding bzw. einer nicht virämischen Infektion gesprochen, wobei LABUDA et al. (1993) diesen Vorgang in Bezug auf das FSME-Virus beobachtet hat. Neben der Ausscheidung bei der Blutmahlzeit aufgenommener Erreger mit dem Kot können Pathogene endozytotisch von den Mitteldarmzellen aufgenommen werden (PATTON et al. 2012). Halten die Erreger dem angeborenen Immunsystem der Zecken, bestehend aus zellulären Bestandteilen wie Hämozyten und humoralen Faktoren, z.B. Defensine und Lysozyme, stand, können sie langfristig in der Zecke verbleiben (SONENSHINE und HYNES 2008). Hat eine Larve oder Nymphe einen Infektionserreger aufgenommen, ist eine Übertragung auf das nächste Stadium für eine erneute Infektion eines Wirts nötig. Ist der Erreger während dieser transstadialen Übertragung oder der Fixation der Zecke am Wirt in der Lage, in die Speicheldrüsen zu migrieren, ist eine Ausscheidung mit dem Speichel und somit durch den Zeckenstich möglich. Wenn Eier bzw. die daraus schlüpfenden Larven eines infizierten Weibchens ebenfalls den Erreger in sich tragen, spricht man von einer transovarialen Infektion, welche bisher nur bei einem kleinen Teil der bekannten zeckenübertragenen Pathogene, u.a. *Rickettsia parkeri* und *Babesia ovata*, beobachtet wurde (HAJDUŠEK et al. 2013, WRIGHT et al. 2015, UMEMIYA-SHIRAFUJI et al. 2017).

### **2.2.8.2 *Coxiella burnetii* in Zecken**

In einem Versuch von DAVIS und COX (1938), in dem *Dermacentor andersonii* an Meerschweinchen saugten und diese fieberhaft erkrankten, wurde der *C. burnetii* Stamm Nine Mile isoliert, welcher bis heute im Labor Verwendung findet. In den darauffolgenden Jahren wurde die transstadiale Übertragung und damit eine Vektorkompetenz in Zecken der Spezies *Haemaphysalis humerosa*, *Haemaphysalis bispinosa* und *Rhipicephalus sanguineus* mittels Infektion an Kleinsäugetern und Färbemethoden nachgewiesen (SMITH 1940, SMITH 1941, SMITH 1942, PHILIP 1948). Auch im Speichel von parenteral infizierten *Hyalomma dromedarii* konnte *C. burnetii* mittels Giménezfärbung nachgewiesen werden (REHÁČEK und BREZINA

1968). Die Infektion der Zecken in diesen Versuchen fand dabei durch Injektion einer infizierten Dottersacklösung in das Haemocoel der Zecken statt. Die Detektion von *C. burnetii* fand üblicherweise durch eine Vortestung der Zecken auf *Rickettsia* spp. mittels Hämocyten-Tests statt, bei welchem Hämolymphe durch die Amputation eines Beingliedes gewonnen und gefärbt wird (REHÁČEK et al. 1971). Dabei wurde häufig die Färbung nach Giménez angewandt, welche eine Rickettsien-spezifische Färbemethode ist (GIMENÉZ 1964). Insbesondere die Schafzecke *Dermacentor marginatus* wird mit der Übertragung von *C. burnetii* assoziiert, auch da in deren Verbreitungsgebiet vermehrt Q-Fieber-Fälle gemeldet werden (LIEBISCH 1976, WALTER et al. 2016). LIEBISCH (1977) infizierte zudem Mäuse und Meerschweinchen parenteral mit Suspensionen potentiell infizierten Zecken und konnte durch die Serologie der infizierten Kleinsäuger ein anschließendes Infektionsgeschehen dieser Versuchstiere nachweisen. Auch aus *I. ricinus* wurden *C. burnetii* isoliert, eine molekularbiologische Bestätigung fand damals jedoch nicht statt (KAASERER et al. 1994). Durch diese Ergebnisse wurde *C. burnetii* seit seiner Entdeckung als zeckenübertragene Erkrankung eingestuft. Seit in den 80er Jahren das Verfahren der PCR Einzug erhalten hat, wurden in Studien weltweit Zecken von Wirten oder durch die Technik des Flaggens aus ihrer Umgebung gesammelt und auf zeckenübertragene Pathogene untersucht (LI und DUNLEY 1998). So kann unter anderem auch die Prävalenz von *C. burnetii* in den betroffenen Gebieten abgeschätzt werden. In Deutschland wurde zuletzt durch HILDEBRANDT et al. (2011) eine Prävalenz von 1,9 % in geflaggten *I. ricinus* ermittelt, während in den Prävalenzstudien von PLUTA et al. (2010) und HARTELT et al. (2008) keine DNA von *C. burnetii* gefunden wurde. In Europa wurden hohe Prävalenzen von über 10 % in verschiedenen Studien in Frankreich, Spanien, Italien sowie Serbien, aber auch in Polen, ermittelt (BONNET et al. 2013, SZYMAŃSKA-CZERWIŃSKA et al. 2013, TOMANOVIĆ et al. 2013, MANCINI et al. 2019, GONZÁLEZ et al. 2020). Bei der Untersuchung von jeweils über 500 Zecken per PCR konnten hingegen in Studien in Ungarn, Frankreich, Österreich, der Slowakei sowie der Schweiz keine Nachweise von Coxiellen-DNA erbracht werden (GYURANECZ et al. 2012, MICHELET et al. 2016, MINICHOVÀ et al. 2017, SCHÖTTA et al. 2017, PILLOUX et al. 2018). In Zecken, welche während des Ausbruchs in den Niederlanden zwischen den Jahren 2006 und 2010 gesammelt wurden, konnten nur fünf positive Zecken von Schafen gesammelt, welche jedoch zuvor geimpft wurden (SPRONG et al. 2012). Zur PCR-Detektion von *C. burnetii* in Zecken stehen eine Vielzahl von Zielgenen, u.a. IS1111 (eine Transposon-ähnliche Insertionssequenz), *icd* (codierend für eine Isocitratdehydrogenase), *sodB* (codierend für eine Superoxiddismutase) und *com1* (codierend für das äußere Membranprotein 1), zur Verfügung (STEIN und RAOULT 1992, BRENNAN und SAMUEL 2003, KLEE et al.

2006). Diese unterscheiden sich durch die hohe genetische Gleichheit von denen der CLE nur geringfügig, sodass weiterführende Untersuchungen, wie eine Sequenzierung, angezeigt sind, um eine Abgrenzung von CLE zu erreichen (DURON 2015, JOURDAIN et al. 2015). So wurde durch DURON (2015) in ca. einem Drittel der untersuchten CLE-infizierten Zecken die Transposon-ähnliche Insertionssequenz IS1111 nachgewiesen. Durch die so möglichen Fehlinterpretationen von PCR-Ergebnissen wird eine Überbewertung der Rolle der Zecke in der Q-Fieber-Übertragung vermutet (DURON et al. 2015b). Der Nachweis eines Erregers innerhalb eines blutsaugenden Wirts gibt zudem nur Aufschluss über dessen Aufnahme, nicht aber über die Überträgerfunktion des entsprechenden potenziellen Vektors (ESTRADA-PEÑA et al. 2013). Für die Feststellung einer Vektorkompetenz sind daher Studien mit künstlich infizierten Zecken unter kontrollierten Bedingungen vonnöten. So wurde beispielsweise in einem Versuch mit *Hyalomma aegyptium* ein vollständiger Lebenszyklus infizierter Zecken einschließlich der horizontalen Übertragung auf ein Meerschweinchen dargestellt und somit die Vektorkompetenz dieser Zeckenart bewiesen (ŠIROKÝ et al. 2010).

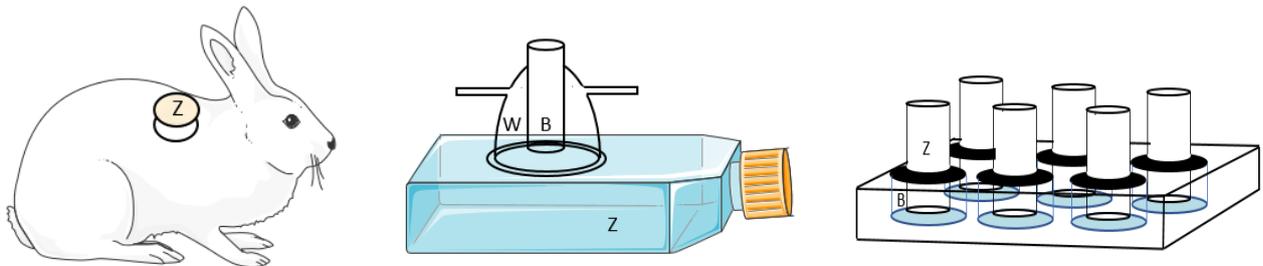
### **2.3 Fütterung von Zecken**

Um Zecken unter Laborbedingungen zu halten sowie deren Lebensweise und Rolle als Vektoren dokumentieren zu können, ist die Bereitstellung einer Blutmahlzeit in jedem Lebensstadium notwendig. Dabei wurden in der Vergangenheit vornehmlich Versuchstiere, z.B. Mäuse, Meerschweinchen oder Kaninchen, als Wirte eingesetzt (LEVIN und SCHUMACHER 2016) (Abb. 4). Im Sinne der Einsparung von Tierversuchen aus Tierschutz- und Kostengründen wurden seit Mitte des letzten Jahrhunderts verschiedene Formen der artifiziellen Fütterung entwickelt (WALADDE et al. 1996). Die Einsatzmöglichkeiten solcher *in-vitro*-Fütterungssysteme umfassen, neben dem Halten und Züchten der Arthropoden, auch die Untersuchung der Übertragung von Krankheitserregern sowie die Testung der Effizienz neuer Akarizide (KUHNERT 1996). Die artifizielle Fütterung von Zecken stellt eine Herausforderung dar, was sowohl durch das komplexe Saugverhalten und die dadurch entstehenden Ansprüche an den Hautersatz als auch durch die lange Fixationsdauer verursacht wird.

#### **2.3.1 Fütterungssysteme**

Verschiedene artifizielle Ansätze Schildzecken zu füttern wurden bereits evaluiert (WALADDE et al. 1996). Zecken können, beispielsweise mittels doppelseitigen Klebandes, fixiert werden und anschließend die Blutmahlzeit über die Mundwerkzeuge verabreicht bekommen. Dafür werden Kapillaren oder Pipettenspitzen verwendet, welche über dem Hypostom angesetzt werden (BROADWATER et al. 2002, KOCAN et al. 2005, RIBEIRO et al. 2014,

VALIM et al. 2017). Diese Systeme haben den Vorteil, dass die aufgenommene Blutmenge direkt kontrollierbar ist. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass die Zecken zunächst für einige Tage auf einem tierischen Wirt gesogen haben, um die Nahrungsaufnahme zu stimulieren. In membranbasierten Fütterungssystemen können sich Zecken hingegen frei bewegen und durch eine tierische oder künstliche Haut, ähnlich dem natürlichen Zeckenstich, an einem Blutreservoir saugen (BONNET et al. 2007, KRÖBER und GUERIN 2007).



**Abbildung 4:** Drei verschiedene Formen der Zeckenfütterung. Links: Fütterung am Tier, Mitte: Fütterung auf Tierhaut nach BONNET et al. (2007), rechts: Membranfütterung nach KRÖBER und GUERIN (2007). B: Blutreservoir, W: Warmwasserreservoir, Z: Zeckenreservoir.

### 2.3.1.1 Membranbasierte Fütterungssysteme

Bei dieser Art der Zeckenfütterung bildet die Membran einen entscheidenden Faktor. Während anfangs meist Tierhäute verwendet wurden, welche sehr anfällig für Verderb sind, wurden später vermehrt artifizielle Membranen eingesetzt (VOIGT et al. 1993, BONNET et al. 2007). Hier können Materialien verwendet werden, die auch für die Fütterung anderer Arthropoden in Frage kommen, z.B. Parafilm® (ZHENG et al. 2015). Da diese Verschlussfolie jedoch keine selbstverschließenden Eigenschaften besitzt, werden Materialien wie Silikon bevorzugt, welches auch bei der Fütterung von Insekten verwendet wird (BAUER UND WETZEL 1976). Die Grundlage der Silikonmembranfütterung für Schildzecken wurde durch KUHNERT (1995) gegeben. Hierbei wurden Glasröhrchen verwendet, welche in einem Honigglas, in welchem sich Blut befand, aufgehängt waren. KRÖBER und GUERIN (2007) brachten dieses System auf eine 6-well-Platte, wodurch sich die Handhabung vereinfachte (vgl. Anhang 8.1). In diesem kontaminationsanfälligen System müssen regelmäßige Blutwechsel aller 8-14 Stunden stattfinden, was eine hohe Arbeitsbelastung darstellt. Daher wurden auch semiautomatisierte Fütterungssysteme etabliert, in denen ein Blutwechsel nur einmal täglich erfolgen muss und zudem ein Blutfluss an den Membranen der Entmischung des Bluts entgegenwirkt (BONNET und LIU 2012, BÖHME et al. 2018).

### 2.3.1.2 Fixierungsstimuli im Zeckenfütterungssystem

Neben der Zusammensetzung, Dicke und Konsistenz der Membran bilden auch das verwendete Blut und dessen Zusätze, die verwendeten Umweltbedingungen sowie Fixierungsstimuli weitere wichtige Faktoren. Als taktile Reize können Haare oder Wolle dienen, welche zur Vermeidung von Kontamination vorwiegend autoklaviert eingesetzt werden (DE MOURA et al. 1997, KRÖBER und GUERIN 2007). Alternativ kommen hier Moskitonetze aus Fiberglas oder Fliesenkreuze zum Einsatz, wobei diese für die Fixation von juvenilen Zeckenstadien ein Hindernis darstellen (BÖHME 2016). Weiterhin ist der Einsatz von Geruch als ein potenter Stimulus beschrieben, dabei können beispielsweise Extrakte auf die Membran gegeben werden oder die künstliche Haut kann an einem Tier gerieben werden (KRÖBER und GUERIN 2007, FOURIE et al. 2013). Zudem sind Zecken untereinander ein starker Reiz, sodass die Anzahl der Zecken in der Kammer entscheidend ist und auch Zeckenkot oder dessen Extrakte das Fixierungsverhalten anregen. KUHNERT et al. (1998) verwendeten außerdem weitere Stimulanzien, wie Buttersäure und Benzaldehyd, um die Nähe eines Wirtes zu simulieren. Ein weiterer wirkungsvoller Stimulus ist Kohlenstoffdioxid. Da dieses in der Ausatemluft von Wirbeltieren vermehrt vorhanden ist, dient dieses Gas der Aktivitätssteigerung von Zecken. Außerdem verlieren Zecken bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration vermehrt Wasser über die Tracheen, was zu Stress und damit zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Fixieren führt (HEFNAWY 1970, VOIGT et al. 1993). Dabei handelt es sich jedoch um einen unbestimmten Reiz, bei welchem zwar das Suchverhalten der Zecken aktiviert wird, jedoch weitere Reize zum Auffinden der Membran notwendig sind. Sobald die Zecke die Membran als künstliche Haut erkannt hat und an dieser fixiert ist, kann die Blutaufnahme erfolgen, welche durch verschiedene Blutzusätze stimuliert werden kann. So wird häufig eine erhöhte Glukosekonzentration des Blutes eingesetzt, die neben der Stabilisierung der Erythrozyten zur besseren Haltbarkeit des Blutes auch als Phagostimulanz fungiert (KRULL et al. 2017). Außerdem können Glutathion sowie ATP das Saugverhalten steigern (SOARES et al. 2013). Fütterungsversuche finden meist entweder bei 37 °C oder bei Raumtemperatur mit auf 37 °C erwärmtem Blut statt (YOUNG et al. 1996, TRENTELMAN et al. 2017, BÖHME et al. 2018). Weiterhin kann die Zeckenfütterung auch im Wasserbad stattfinden (KRÖBER und GUERIN et al. 2007, OLIVER et al. 2016). Ein so erzeugter Temperaturgradient kann als Stimulus für die Fixation der Zecken dienen (OLIVER et al. 2016).

### 2.3.1.3 Experimentelle Infektionen im membranbasierten *in-vitro*-System

Das membranbasierte Fütterungssystem kann zur Modellierung vektorübertragener Pathogene eingesetzt werden. Dabei wurden *in-vitro*-Fütterungssysteme bereits für die Untersuchung von

Protozoen, Bakterien und Viren eingesetzt. TAJERI et al. (2016) konnten dabei die Aufnahme von *Theileria lestoquardi* durch die Speicheldrüse von *Hyalomma anatolicum* nachweisen, während WALADDE et al. (1995) ein membranbasiertes Fütterungssystem zur Untersuchung von *Theileria parva* in *Rhipicephalus appendiculatus* benutzten. Neben Theilerien untersuchten VOIGT et al. (1993) auch die Übertragung von *Ehrlichia ruminantium* (früher *Cowdria ruminantium*) mittels eines *in-vitro*-Systems. Auch *Babesia* spp. wurden im Rahmen solcher Fütterungssysteme untersucht (BONNET et al. 2007). OLIVER et al. (2016) untersuchten mittels der Silikonmembran-basierten Fütterungseinheiten verschiedene bakterielle Erreger, unter anderem *Borrelia burgdorferi* und *Anaplasma phagocytophilum* auf die Aufnahme durch adulte *Ixodes scapularis* sowie die transstadiale Übertragung von Nymphen zu Adulten. Auch *Ehrlichia canis* sowie das FSME- und das West-Nil-Virus wurden bereits mithilfe eines artifiziellen Systems an Braune Hundezecken verfüttert und die transstadiale Übertragung dieser Pathogene untersucht (FOURIE et al. 2013, LIEBIG et al. 2020, RĂILEANU et al. 2020). Weiterhin kann auch der Zeitpunkt der möglichen Übertragung mit dem Speichel mittels des artifiziellen Fütterungssystems eruiert werden (OLIVIERI et al. 2018).

### **3 Veröffentlichungen**

#### **3.1 Stellungnahme zum Eigenanteil an den Arbeiten zur Publikation**

Das systematische Review wurde am IBIZ unter der Betreuung von Dr. Katja Mertens-Scholz angefertigt, welche an der Konzeption der Studie beteiligt war. Die Literaturrecherche und Auswertung wurden eigenständig durchgeführt. Die Extraktion der Daten aus den einzelnen Studien fand zusätzlich durch jeweils einen weiteren Co-Autor als Kontrolle statt. Die Analyse der Daten und die statistischen Berechnungen wurden durch mich durchgeführt.

Der Textentwurf sowie die graphischen Darstellungen habe ich selbstständig erstellt.

Das Manuskript wurde für die Publikation in Zusammenarbeit mit allen Co-Autoren fertiggestellt.

## 3.1.1 Publikation 1



# The Prevalence of *Coxiella burnetii* in Hard Ticks in Europe and Their Role in Q Fever Transmission Revisited—A Systematic Review

Sophia Körner<sup>1</sup>, Gustavo R. Makert<sup>2</sup>, Sebastian Ulbert<sup>2</sup>, Martin Pfeffer<sup>3</sup> and Katja Mertens-Scholz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Bacterial Infections and Zoonoses (IBIZ), Friedrich-Loeffler-Institute, Federal Research Institute for Animal Health, Jena, Germany, <sup>2</sup>Department of Immunology, Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology, Leipzig, Germany, <sup>3</sup>Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Leipzig, Germany

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Sandra Diaz Sanchez,  
University of Castilla-La  
Mancha, Spain

### Reviewed by:

Sandra Antunes,  
Universidade NOVA de  
Lisboa, Portugal  
Quan Liu,  
Foshan University, China

### \*Correspondence:

Katja Mertens-Scholz  
katja.mertens-scholz@fli.de

### Specialty section:

This article was submitted to  
Parasitology,  
a section of the journal  
Frontiers in Veterinary Science

**Received:** 19 January 2021

**Accepted:** 22 February 2021

**Published:** 26 April 2021

### Citation:

Körner S, Makert GR, Ulbert S,  
Pfeffer M and Mertens-Scholz K  
(2021) The Prevalence of *Coxiella*  
*burnetii* in Hard Ticks in Europe and  
Their Role in Q Fever Transmission  
Revisited—A Systematic Review.  
Front. Vet. Sci. 8:655715.  
doi: 10.3389/fvets.2021.655715

The zoonosis Q fever is caused by the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. Besides the main transmission route *via* inhalation of contaminated aerosols, ticks are discussed as vectors since the first isolation of the pathogen from a *Dermacentor andersonii* tick. The rare detection of *C. burnetii* in ticks and the difficult differentiation of *C. burnetii* from *Coxiella*-like endosymbionts (CLEs) are questioning the relevance of ticks in the epidemiology of Q fever. In this review, literature databases were systematically searched for recent prevalence studies concerning *C. burnetii* in ticks in Europe and experimental studies evaluating the vector competence of tick species. A total of 72 prevalence studies were included and evaluated regarding DNA detection methods and collection methods, country, and tested tick species. Specimens of more than 25 different tick species were collected in 23 European countries. Overall, an average prevalence of 4.8% was determined. However, in half of the studies, no *Coxiella*-DNA was detected. In Southern European countries, a significantly higher prevalence was observed, possibly related to the abundance of different tick species here, namely *Hyalomma* spp. and *Rhipicephalus* spp. In comparison, a similar proportion of studies used ticks sampled by flagging and dragging or tick collection from animals, under 30% of the total tick samples derived from the latter. There was no significant difference in the various target genes used for the molecular test. In most of the studies, no distinction was made between *C. burnetii* and CLEs. The application of specific detection methods and the confirmation of positive results are crucial to determine the role of ticks in Q fever transmission. Only two studies were available, which assessed the vector competence of ticks for *C. burnetii* in the last 20 years, demonstrating the need for further research.

**Keywords:** ticks, *Coxiella*, prevalence, molecular detection, *Coxiella*-like, endosymbionts, vector

## INTRODUCTION

*Coxiella burnetii* as the causative agent of the zoonosis Q fever is distributed worldwide, except New Zealand. This infectious disease may have a significant impact on animal welfare, human health, and economies (1, 2). *Coxiella burnetii* is a gram-negative bacterium that replicates as an obligate intracellular pathogen under acidic and microaerophilic conditions in phagolysosome-like compartments of cells, predominantly macrophages (3). Infection of hosts mainly occurs due to inhalation of contaminated dust and aerosols (4). During infection, *C. burnetii* shows a tropism for the reproductive tissue and the mammary gland. Therefore, *C. burnetii* is primarily shed during parturition and via the milk (5). The considered main reservoirs for human infections are domestic ruminants, whereas other species, such as dogs or horses, can play a minor role as carriers (6). In their birth products, large amounts of infectious agents can be detected (7, 8). As the infective dose by inhalation is <10 bacteria, farmers, and veterinarians are especially at high risk of acquiring this disease through contact with infected animals and their products (9, 10). *Coxiella burnetii* develops spore-like forms, which are resistant to environmental stressors such as desiccation or sunlight. Therefore, the bacteria survive under adverse conditions over long periods in the soil or other dry substances (11).

An infection in ruminants, also termed coxiellosis, is often asymptomatic and not noticed until human Q fever cases occur (12). Decrease in fertility and increase of abortion and stillbirth are common indications of an ongoing Q fever disease in herds or flocks of ruminants (13, 14).

Outbreaks of Q fever, as seen in the Netherlands in 2007–2010, clearly show the huge impact of this infectious disease not only on agricultural economics but also on human health (15, 16). Acute human Q fever infection presents mainly flu-like symptoms with possible complications concerning the lung and liver. Although 60% of acute cases remain asymptomatic, in 1–5% of cases, chronic Q fever may develop (17, 18). This often affects the heart valves as endocarditis. Antibiotic treatment is mandatory over months and, in some cases, up to several years (17–19). Besides the long and difficult treatment, the disease can also be fatal in acute and chronic cases. Although the mortality of acute Q fever was assessed to be 1% in a study on hospitalized patients, the mortality in chronic cases has been reported as 13% and even up to 38% during the Dutch outbreak mentioned earlier (1, 18, 20).

The bacterium is known as an infectious agent since the 1930s when it caused an outbreak of query fever among abattoir workers. In the years after its first isolation from a *Dermacentor andersonii* tick (21), early experimental studies showed horizontal transmission of the agent from ticks to mammalian hosts and suggested that several tick species, e.g., *Haemaphysalis humerosa*, *Haemaphysalis bispinosa*, and *Rhipicephalus sanguineus*, may be capable of transmitting *C. burnetii* (22–25). Although transstadial transmission was shown for most of the examined tick species, the transovarial transmission was reported rarely (25, 26). Later, it was demonstrated that *Hyalomma dromedarii* infected by inoculation

excreted *C. burnetii* with their saliva (27). Duron et al. summarized the vector competence data for seven hard tick species (28). Hence, since its first detection, *C. burnetii* has been discussed as a ruminant-associated tick-borne bacterium.

During outbreaks of Q fever, ticks are regularly tested for *C. burnetii*. Until today, no *C. burnetii*-positive ticks associated with outbreaks have been documented. Human infection after tick exposure has been reported, but due to the predominant infection route by inhalation, the source of infection remains unclear (29, 30).

Besides pathogen transmission, ticks are host to many endosymbionts and harbor a diverse microbiome (31). Although *C. burnetii* was the only known member of the genus *Coxiella* for a long time, closely related bacteria were found in recent studies, referred to as *Coxiella*-like endosymbionts (CLEs) (32, 33). This heterogenic group of bacteria with different genome sizes and gene content shows up to 97% genome identity with *C. burnetii* (33–37). Genetically, CLEs are classified into four clades (A–D), and *C. burnetii* belongs to clade A, which otherwise contains CLE associated with soft ticks (38).

*Coxiella*-like endosymbionts were detected in many different tick species, and for some species, an obligatory mutualism was proven (39–41). As obligate hematophagous arthropods, ticks are dependent on external vitamin B synthesis, likely supplied by the harbored bacteria (40, 42). Furthermore, a positive effect on fecundity was shown for *R. sanguineus*. Treatment with ofloxacin resulted in a significantly lower egg mass, hatching rate, and viability of larvae in this tick species (39). Similar results were shown for *Haemaphysalis longicornis*, *Rhipicephalus microplus*, and *Rhipicephalus haemaphysaloides*, which were treated with tetracycline and kanamycin, respectively, indicating the influence of CLE on reproduction (43–45).

CLEs seem to be apathogenic, but single studies showed pathogenic potential in particular cases. Fatal infection with CLE was occasionally observed in different bird species (46–48). Furthermore, a skin-associated inflammation caused by the tick-borne bacterium *Candidatus Coxiella massiliensis* was described (49).

The polymerase chain reaction was established in the 1980s and was subsequently used as the predominant detection method. Until then, ticks were primarily tested for the occurrence of *C. burnetii* and related pathogens with staining methods and animal infection experiments (50–52). Because *C. burnetii* is difficult to isolate and cultivate as an obligate intracellular organism, molecular diagnostic using PCR is the method of choice for its detection. Various protocols target several plasmids and chromosomal genes, for example, IS1111, *icd*, *com1*, *sodB*, and GroEL/*htpB* (53–55). The target gene IS1111 is a transposase-like insertion sequence, and the amount of copies from 7 to 110 per genome varies between isolates. Thus, the use for quantification is limited, but due to the higher number of targets per bacterium, this signal amplification leads to a higher sensitivity compared with single-copy targets (53). In contrast, *icd*, encoding for the isocitrate dehydrogenase gene, and *com1*, encoding for the *C. burnetii* outer membrane protein 1, are single-copy genes allowing quantification (53, 54). The commonly used target genes for *C. burnetii* cross-react with

CLE and may lead to misidentification (28, 56). In a study by Duron, roughly one-third of CLE-positive ticks were positive for the IS1111 element (57). Furthermore, IS1111 was shown to be the most unspecific marker for detection of *C. burnetii* in CLE-positive ticks, followed by GroEL/*htpAB* (for chaperone heat shock protein), whereas *icd* was not amplified in the samples (56). However, the *icd* sequence of a novel CLE derived from *Carios capensis* soft ticks was >90% similar to *C. burnetii* (58). As a consequence, usage of a target gene of low specificity could lead to an overestimation of the role of ticks as host and vector of *C. burnetii*. To distinguish between *C. burnetii* and CLE, there is no specific method available, owing to the fact that the group of CLE is very heterogeneous. Therefore, the most reliable method is the sequencing of PCR-positive samples using highly conserved genes such as *rrs* or *groEL* (56, 59).

Ticks (Ixodida) are obligate blood-feeding ectoparasites with a global distribution. A total of 67 tick species are reported in Europe and Northern Africa (60). Out of these, only a small number, i.e., 15–17 hard tick species, depending on their confirmed taxonomic status as a distinct species or subspecies, have been found to harbor either *C. burnetii* or CLE (28, 61). When considering a particular tick species to serve as a vector for a given pathogen, certain aspects of the tick's life cycle should be considered in addition to the sole finding of molecular traces or even morphological structures within an examined tick. This information will help to understand further whether this tick species has vector competence, defined as the capability to transmit a given pathogen horizontally or vertically, which is an essential aspect of the vector capacity. The latter is more relevant for determining the infection risk, as it includes parameters such as longevity, feeding behavior (duration, frequency, and preferred blood source), population density, and frequency of host contact encounters. In this regard, ticks, which are feeding on different hosts in every life stage (three-host-ticks) with a large geographical range, high population densities, and promiscuous feeding behavior are relevant, when it comes to pathogen transmission. The most common hard tick of Europe, the castor bean tick *Ixodes ricinus*, is fulfilling these criteria, making it the most important vector tick species for bacterial and viral tick-borne diseases, e.g., *Borrelia burgdorferi* s.l. or tick-borne encephalitis virus, in Europe (62). Such vector-borne agents, some with a wide range of host species, may have their reservoir in wildlife, leading to a sylvatic transmission cycle between arthropods and wild animals. In addition, transmission can also occur in an urban or domestic cycle, including pets, livestock, or humans. Although *I. ricinus* is ubiquitous in Europe, other relevant tick species are not, and only for some geo-referenced distribution maps are available, e.g., for both *Dermacentor* species (63). However, the geographical distribution of a particular tick species is not static but rather subject to permanent habitat changes due to increased movement of humans, animals, and goods and, very importantly, the increasing ambient temperatures as major drivers. The high frequency of recent introductions of *Hyalomma* spp. ticks into temperate Europe is impressive sign of a very menacing trend of potent vector tick species moving into new areas (64, 65).

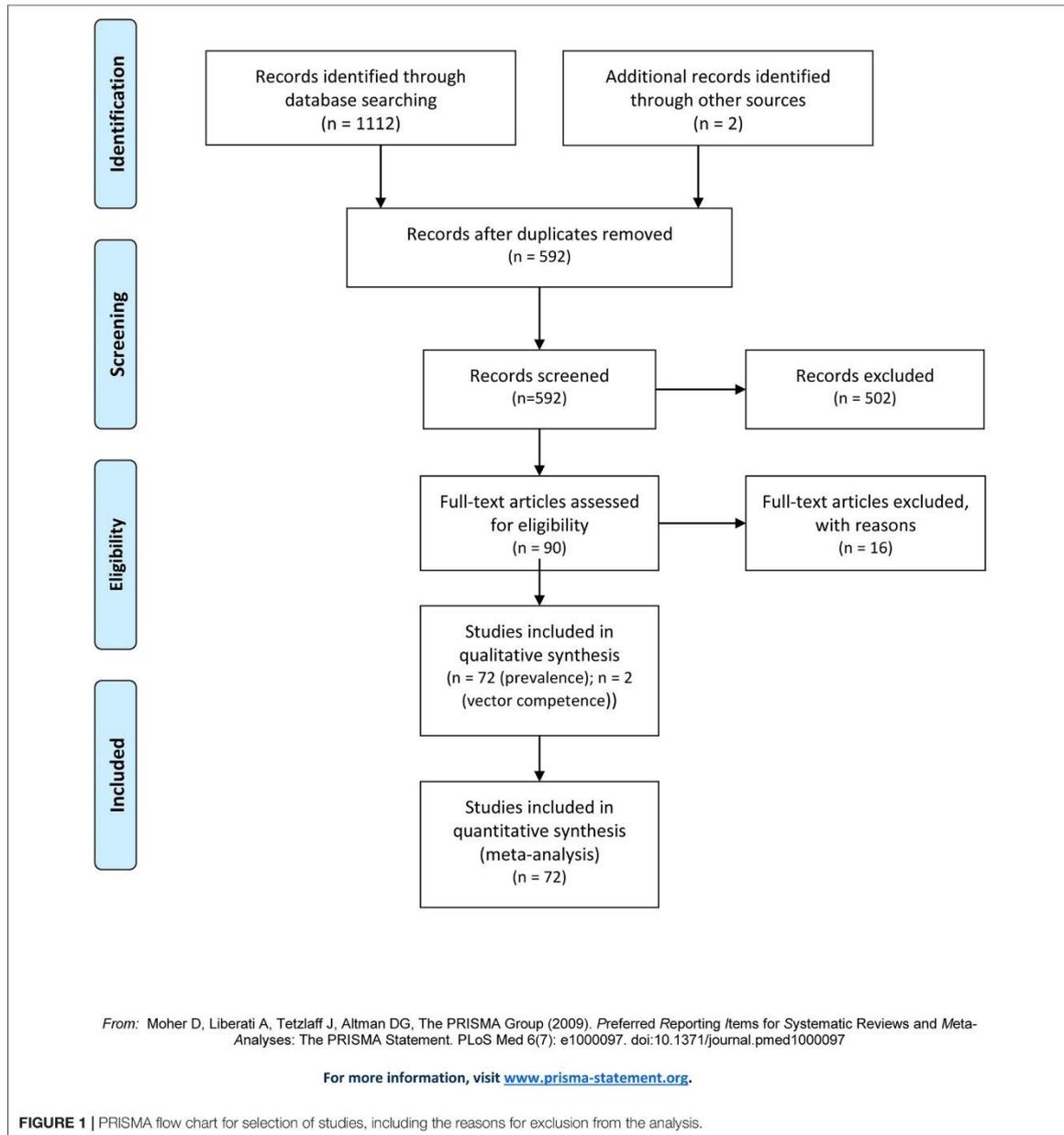
Recent prevalence studies using molecular methods aim at determining the percentage of ticks carrying *C. burnetii* among other diverse tick-borne pathogens. This allows surveillance of *C. burnetii* in ticks and benefits the identification of a potential risk of acquiring a Q fever infection by a tick-bite for humans or domestic animals.

Different methods exist for the sampling of ticks. As most European hard ticks seek hosts by questing on the vegetation and naturally intend to be wiped up by a passing host, the mainly used collection method is flagging or dragging. Using this method, a cotton blanket is dragged or flagged over the vegetation, considering that both methods favor different tick species (66). Ticks are stripped off and are hindered in their motion by the weave. The success of this method depends on the texture of the blanket and the structure of the vegetation (67). Activity peaks of most questing ticks are in spring and autumn. However, other studies observed a trend to a unimodal peak with the highest activity in the spring months (68, 69). Ticks can also be removed directly from their host. This method is used to examine the burden of pathogens associated with these animals and for the sampling of hunting ticks, such as *Hyalomma* spp., which are less likely to be collected by flagging (70).

This review gives a comprehensive overview of the present literature on *C. burnetii* in ticks and discusses the vector competence of European tick species for the Q fever agent. To this end, data of prevalence studies conducted in Europe concerning the occurrence of *C. burnetii* in ticks were systematically compiled and analyzed regarding the spatial occurrence, molecular detection method used, and the frequency of detection per tick species, as well as the detection of CLE. Furthermore, experimental approaches to investigate the vector competence of tick species for *C. burnetii* were collected. The determination of the vector competence of ticks is important to assess the role of ticks as a reservoir in Q fever epidemiology.

## MATERIALS AND METHODS

Studies about *C. burnetii* in ticks were classified into two different categories. One group investigates the prevalence of ticks for *C. burnetii* in Europe. The other group discusses the vector competence of ticks based on experimental approaches on ticks infected under laboratory conditions. For identification of studies, the databases Pubmed and Web of Science were systematically searched for articles in English, published between 2000 and 2020. Search terms were “*coxiella* tick,” “*coxiella*-like,” “*coxiella* vector competence.” The search was completed on October 27, 2020. Additional studies were included using Google Scholar. References were sorted by the use of Endnote X7 (Clarivate Analytics, Philadelphia, USA). Only studies using DNA detection methods for *Coxiella* spp. on hard ticks obtained in Europe were included as prevalence studies. The definition of Europe used in this study refers to a geographical demarcation as von Strahlenberg's, including all countries of which the major part is situated between the Urals and the Bosphorus. Regions were defined according to the United Nations geoscheme for



Europe in Southern Europe, Eastern Europe, Northern Europe, and Western Europe (71).

Further criteria for eligibility as prevalence studies were stated information of the number of tested ticks, the number of *Coxiella*-positive ticks, or amount and description of tick pools and at a minimum description of the tick genus or species name.

Data were extracted regarding information about the country in which the ticks were obtained. Furthermore, the number of tested and *Coxiella*-positive ticks and tick pools and the collection and detection method were included in the analysis. All publications were read, and data were extracted by two persons independently.

The proportion of positive ticks was calculated as the ratio of positive ticks to the total number of tested ticks. Prevalence was defined as the proportion of positive ticks multiplied by 100. When ticks were tested in pools, the proportion was estimated as minimum infection rate (MIR) using the formula

$$\text{MIR} = \frac{\text{number of positive pools}}{\text{number of tested specimen}}$$

Studies were evaluated, and confidence interval was calculated using Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, USA). For statistical analysis, the Kruskal–Wallis test and Mann–Whitney U test for data lacking normal distribution were performed using SPSS V.22 (IBM, Armonk, USA), and results were considered significant in the case of  $p < 0.05$ .

## RESULTS

A total of 590 studies were found using the mentioned search terms. Additionally, two studies using the platform Google Scholar were included. Based on the title and abstract, 502 studies were excluded. Main reasons for exclusion were non-European studies ( $n = 272$ ), no hard ticks tested ( $n = 120$ ), or reviews ( $n = 44$ ); 66 studies were excluded for other reasons (Figure 1: PRISMA analysis). After full-text analysis, 16 further studies were removed. Finally, 72 publications in which the prevalence of *C. burnetii* in ticks collected in European countries were examined, compiled, and evaluated. Additionally, two vector competence studies were included.

### Prevalence Studies in Europe—A Systematic Analysis

Prevalence studies were analyzed by country, the number of tested ticks, tick species, the method used for tick collection, and the method used for detection of *C. burnetii* (Supplementary Table 1). The ticks tested in these studies were sampled between 1994 and 2018. In more than half of the studies ( $n = 44$ ), ticks were collected between the years 2011 and 2013. Studies were performed in 23 of 45 different European countries.

Most collection areas were rural, single studies collected ticks in recreational areas in urban settings (72, 73). Furthermore, ticks were sampled from vegetation and animals on European islands (74–77).

In total, 115,265 ticks were tested in all 72 analyzed studies, of which 62,889 were sampled in a single and thus largest study performed in Switzerland (78). Excluding this study, on average, 689 ticks were sampled per study, ranging from 18 to 7,050 samples. The mean prevalence of *C. burnetii*-DNA over all evaluated studies was 4.8%. In half of the studies ( $n = 38$ ), no *C. burnetii*-positive tick was identified. The highest prevalence was determined to be 54.2% in a Spanish study (79). Of the 34 studies with positive results, 10 (29.4%) confirmed the results with the sequencing of at least one PCR amplicon. Sequencing could not be performed in some cases because of low DNA yield (80). Ticks were sampled by flagging or dragging from the vegetation or removed from animals.

Most studies simultaneously gathered further information, e.g., about tick infestation of local animal species or other tick-borne pathogens. In addition, the seroprevalence for *C. burnetii* or other tick-borne agents of captive domestic and wild animals was examined (79–82).

### Country

There were major differences in prevalence between different countries and regions in Europe (Figure 2, Supplementary Figure 1). The majority of studies were performed in Southern Europe ( $n = 30$ ), whereas the number of prevalence studies per country was highest for Slovakia ( $n = 12$ ). A high prevalence was found in studies in Southern Europe, especially in Spain (10.1%) and Portugal (10.6%), but also in Poland, a high proportion of ticks was positive (8.5%). In ticks tested in Northern Europe, no *C. burnetii* was detected (83–86).

The highest prevalence within single studies was determined in Spain and Italy. González et al. detected *Coxiella*-DNA in over 50% of the 236 tested ticks (79). In studies from Italy and France, more than 30% of tested ticks were found to be positive for *C. burnetii*-DNA (87–89). The mean prevalence in Southern Europe (8.3%) was significantly higher than in the rest of Europe (Mann–Whitney U test;  $p = 0.031$ ), especially in Western Europe (2.1%) (Mann–Whitney U test;  $p = 0.013$ ).

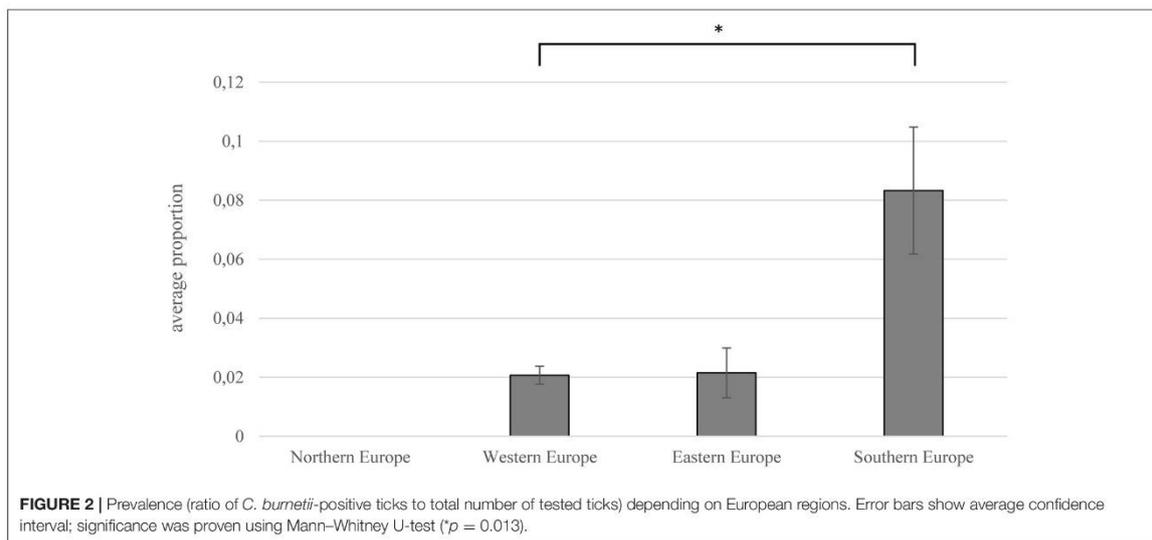
### Tick Species

More than 25 tick species were examined in all studies (Table 1). In *Amblyomma* spp., *Haemaphysalis inermis*, *Hyalomma scupense*, *Hyalomma truncatum*, *Ixodes festai*, and *Ixodes hexagonus*, no molecular detection of *C. burnetii*-specific DNA was reported. Furthermore, in *Haemaphysalis hispanica*, *Hyalomma aegyptium*, *Hyalomma lusitanicum*, *Ixodes ventraloi*, *Rhipicephalus pusillus*, and *Rhipicephalus thuranicus*, *Coxiella*-DNA was detected, but the results were not sequenced for confirmation or discriminated from CLE.

Differences in detecting *C. burnetii*-positive ticks were noticed for the tick genera tested (Figure 3). The highest prevalence was observed in *Hyalomma* spp. ticks (11.3%). Of the six species tested, *Hyalomma rufipes*, *Hyalomma marginatum*, *H. lusitanicum*, and *H. aegyptium* were positive for *C. burnetii*. The most abundant and most often infected species was *H. lusitanicum*, in which 17.7% of ticks were PCR positive for *C. burnetii*. Furthermore, 6.0% of all tested *Rhipicephalus* spp. were positive for *C. burnetii*-DNA, whereas *Dermacentor* spp. harbored *Coxiella*-DNA in 1.4% of samples. By far, the most tested ticks belonged to the genus of *Ixodes* spp. (81.4%). Of these ticks, only 0.4% carried *C. burnetii*-DNA. The second least *Coxiella*-infested tick species was *Haemaphysalis* spp. with 1.2% positive samples. Of *Amblyomma* spp., only 11 negative ticks were flagged or removed from birds, which is not surprising, as this genus is not endemic in Europe (77, 90).

### Collection Method

The most common methods for prevalence studies were sampling from animals ( $n = 29$ , 40.3%; 11,283 ticks) or from the vegetation by dragging or flagging a piece of cotton ( $n =$



27, 37.5%, 83,476 ticks). Overall, in the evaluated studies, 72.4% of all tested ticks were derived from vegetation. In 19.4% ( $n = 14$ ; 19,939) of the examined studies, a combination of sampling from animals or humans and flagging was performed. Data in this review were not divided into the different collection methods used. Two studies examined the occurrence of pathogens in ticks exclusively collected from humans (123, 124). The highest mean prevalence for *C. burnetii* was found in studies in which ticks were removed from infected animals with 6.6%, whereas the mean prevalence in ticks collected from vegetation was 2.8% (Figure 4A). Of all tested ticks removed by flagging, 0.5% were positive for *C. burnetii*-DNA (Figure 4B). Tested animals ranged from pets and livestock to trapped rodents or game. In some studies, ticks were removed from birds to examine their role as hosts and vehicle for tick species (81, 88, 125).

*C. burnetii* was detected in two *H. marginatum*, feeding on humans in Sardinia. Contrary, in two studies that tested human-derived ticks exclusively, all were negative for *C. burnetii*-specific DNA (76, 123, 124).

The only study that was directly associated with a Q fever outbreak was performed in the Netherlands. Almost 3,000 ticks were sampled from nature, domestic animals, and wildlife. No *C. burnetii*-positive questing tick was found, whereas five female ticks collected from animals were positive for IS1111 and *com1* target sequences, suggesting uptake of blood from a bacteremic host (111). Further investigations revealed that these positive ticks were collected from recently vaccinated sheep. This might indicate a low risk of field infection during the outbreak.

### Detection Method

Conventional PCR and real-time PCR were applied as a detection method in most of the studies. The predominant target genes for PCR detection were fragments of the insertion sequence IS1111 ( $n = 37$ , 51.4%, 33,626 ticks) or the genes *com1* ( $n = 14$ , 19.4%,

10,725 ticks), *icd* ( $n = 12$ , 16.7%, 17,631 ticks), *sodB* ( $n = 5$ , 6.9%, 3,502 ticks), and *htpAB* ( $n = 4$ , 5.6%, 3,192 ticks). Single studies used more than one target gene for identification (75, 85, 100, 126, 127). Of studies, which used *sodB* as the target gene for *C. burnetii*, an average prevalence of 7.3% was reported (Figure 5A). Of the studies using PCR targeting the *com1* fragment, the mean prevalence was 0.8%. The most frequently used target IS1111 resulted in an average prevalence of 5.7%. Of all ticks tested with IS1111, 3.0% were positive, which is the highest percentage (Figure 5B). The largest sampling size of 62,889 ticks, exclusively *I. ricinus*, was collected in a study in Switzerland. No *C. burnetii*-positive tick was detected by using *ompA* as the target gene in this study (78). Also, 16S ribosomal RNA (rRNA) sequencing was used for the detection of *Coxiella* spp. in eight studies; one of them detected *C. burnetii*-positive ticks (102).

Before PCR detection, some studies used the hemocyte test for visual detection of *Coxiella* spp. and morphologically similar agents in the hemolymph (91, 104). In these studies, *C. burnetii* was detected by PCR in four hemocyte-positive ticks, but also in two hemocyte-negative ticks.

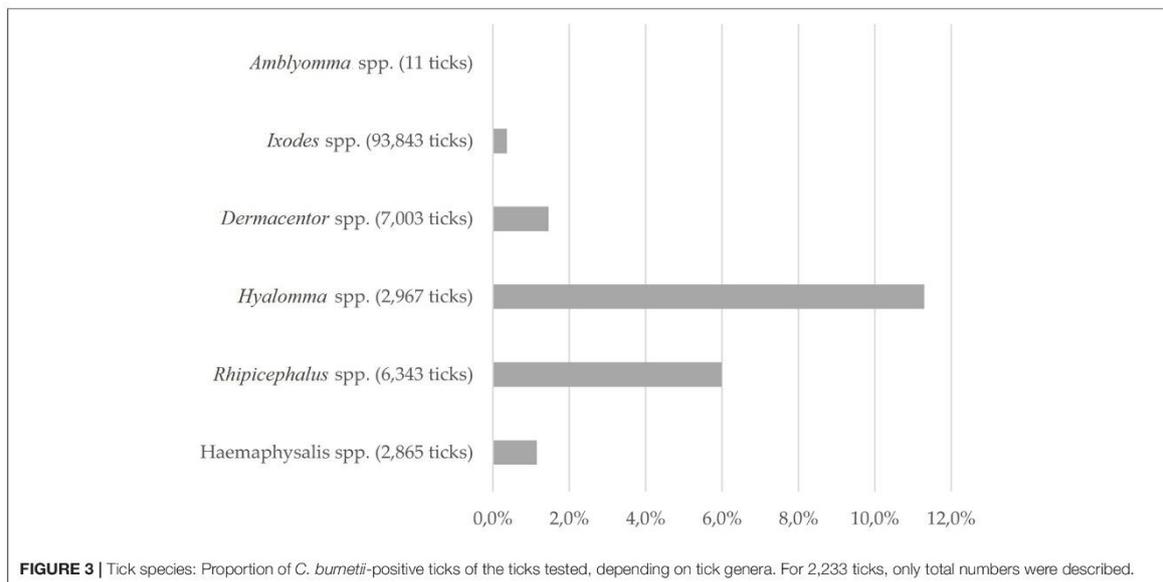
Furthermore, studies used non-molecular methods in addition to PCR, such as cultivation in cells or embryonated eggs, resulting in the isolation of *Spiroplasma* spp. but not *C. burnetii* (126).

### Coxiella-Like Endosymbionts

Some authors considered CLE and searched specifically for these endosymbionts or detected CLE by sequencing positive PCR products. Furthermore, sequencing of 16S rRNA was used to evaluate the tick microbiome (99, 103). In seven studies, CLEs were detected additionally or exclusively using sequencing in a variety of tick species, or *Coxiella* was only identified on genus level (99, 102, 103, 110, 119, 122). Nine tick species were found to harbor CLE in these studies.

**TABLE 1** | Selected tick species collected in Europe and detection of *C. burnetii* and CLE (Reference).

Tick species	Molecular detection of <i>C. burnetii</i>	samples sequenced	Vector competence studies	Detection of CLE
<i>Dermacentor marginatus</i>	Yes (72, 90–97)	Yes (93)	Fecal excretion (98)	Yes (99)
<i>Dermacentor reticulatus</i>	Yes (82, 92, 100, 101)	Yes (82, 101, 102)	–	Yes (102, 103)
<i>Haemaphysalis concinna</i>	Yes (91, 101, 104, 105)	Yes (101)	–	–
<i>Haemaphysalis inermis</i>	No	–	–	Yes (102)
<i>Haemaphysalis punctata</i>	Yes (72, 80, 90, 93, 106)	Yes (93)	–	–
<i>Haemaphysalis sulcata</i>	Yes (74, 93, 95)	Yes (93)	–	–
<i>Hyalomma aegyptium</i>	Yes (107)	No	Transstadial transmission (108)	–
<i>Hyalomma lusitanicum</i>	Yes (79, 90, 94)	No	–	–
<i>Hyalomma marginatum</i>	Yes (76, 87, 88, 97)	Yes (76)	–	–
<i>Hyalomma rufipes</i>	Yes (88)	–	–	–
<i>Hyalomma scupense</i>	No	–	–	–
<i>Hyalomma truncatum</i>	No	–	–	–
<i>Ixodes acuminatus</i>	Yes (109)	Yes (109)	–	–
<i>Ixodes festai</i>	No	–	–	–
<i>Ixodes hexagonus</i>	No	–	–	Yes (99, 110)
<i>Ixodes ricinus</i>	Yes (72, 80, 81, 91, 92, 94, 96, 101, 102, 104, 105, 109, 111–117)	Yes (101, 102, 109, 112)	fecal excretion and transstadial transmission (98)	Yes (99, 102, 110, 118)
<i>Ixodes ventralloi</i>	Yes (96)	No	–	–
<i>Rhipicephalus annulatus</i>	Yes (76, 87)	Yes (76)	–	–
<i>Rhipicephalus bursa</i>	Yes (76, 87, 93, 97)	Yes (76, 93, 97)	–	Yes (99, 119)
<i>Rhipicephalus pusillus</i>	Yes (90, 94)	No	–	–
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Yes (74, 76, 90, 93, 96, 97, 120, 121)	Yes (76, 93, 95, 97)	historic: transstadial transmission (22)	Yes (99, 110, 122)
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	Yes (72, 74)	No	–	Yes (122)

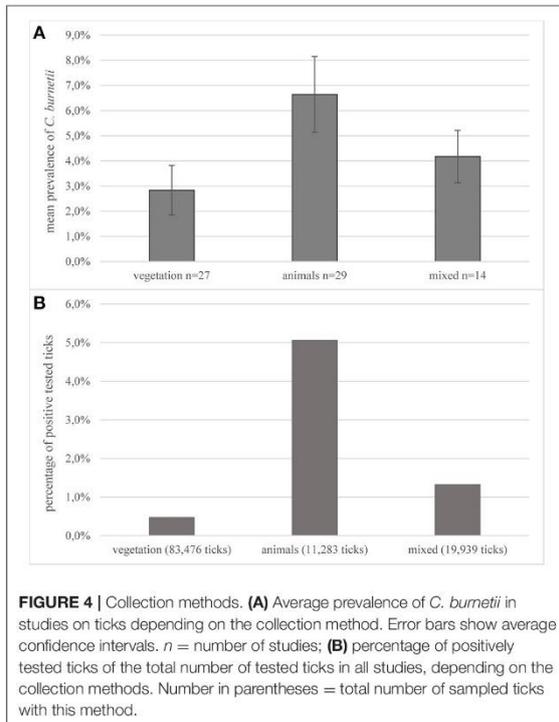


**FIGURE 3** | Tick species: Proportion of *C. burnetii*-positive ticks of the ticks tested, depending on tick genera. For 2,233 ticks, only total numbers were described.

### Experimental Vector Competence Studies

In the decades after the first isolation of *C. burnetii* from a tick, experimental transmission studies were conducted on various

tick species. However, only two recent investigations on the vector competence of ticks under laboratory conditions were found in the literature.



In one study, the vector competence of the tick *H. aegyptium* was proven, including the transstadial transmission over all life stages (108). Larvae were fed on infected guinea pigs, and 5.6% tested positive after molting into nymphs. After feeding on an infected host, 28.9% of nymphs molted into adults remained positive. In addition, reinfection of uninfected guinea pigs was shown in this study.

For *I. ricinus*, a transstadial transmission from nymphs to adults was shown using an *in vitro* feeding system, enabling better differentiation between the transmission *via* saliva or feces (98). The transstadial transmission rate from nymphs to adults was determined to be 25%, but horizontal transfer into the blood was not shown, whereas the ticks excreted infectious feces during feeding and after molting.

## DISCUSSION

### Higher Prevalence in the Mediterranean Region Might Be Associated With Regional Distribution of Different Tick Species

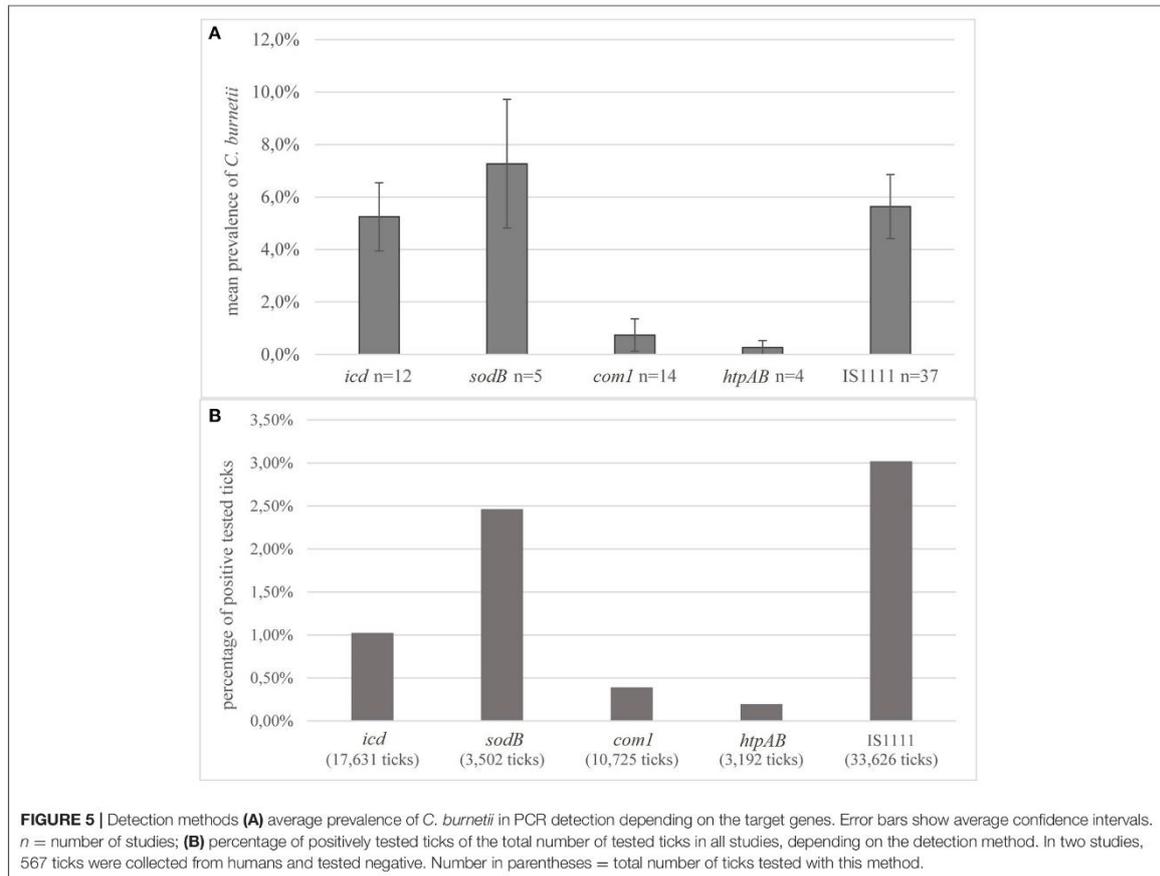
Duron et al. found an average prevalence of 5% of *C. burnetii* in ticks after evaluation of 60 studies conducted worldwide (28). The data of the present study show a similar mean prevalence of studies on ticks in Europe. Here, an update is provided, enhancing the insight into the prevalence of *C. burnetii* in various tick species,

demonstrating that there is a huge variation between the results of different studies depending on the country, tested species, method of collection, and *C. burnetii* detection method applied.

Evaluating the studies, a gradient from North to South was noticed, resulting in a higher prevalence in the Mediterranean region, followed by Eastern Europe. Most positive samples were obtained in Southern Europe, especially Portugal, Spain, and Greece. Here, species of the genera *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, and *Haemaphysalis* are the most abundant vector ticks. Due to climate change associated with global warming, the spread of arthropods is expected (128), which could possibly lead to an increased role of pathogen transmission by these tick species in Western and Northern Europe. The tick species *H. marginatum* was detected in the last years more often in Central Europe and hibernation of this species was recently observed in Germany (64). Since in most of the studies, no confirmation of positive results by specific methods for *C. burnetii* was performed, an inadvertent detection of CLE cannot be excluded. However, this differentiation is extremely important because CLEs seem to have less if at all pathogenic potential than *C. burnetii*.

*Coxiella burnetii* is rarely found in ticks in most of the regions in Europe. It is presumed that ticks play a minor role in Q fever transmission, also considering that no validated human cases of *C. burnetii* infection via ticks have been reported. Foci in which ticks may play a role as the natural reservoir for Q fever seem to exist, but these hot spots are hard to detect. Similar patterns of regional foci were described for tick-borne encephalitis virus (129, 130). The absence of *C. burnetii*-infected ticks in endemic areas is often explained by narrow hot spots (131). That causes less frequent surveillance of this pathogen in major prevalence studies, mainly focusing on well-described tick-borne infectious agents such as *Anaplasma phagocytophilum* or *B. burgdorferi* s.l. Under these circumstances, there is a lack of data in certain countries and regions. The evaluation of European studies shows that occurrence of *C. burnetii* is highly dependent on the tick species. The most abundant tick species in Europe, *I. ricinus*, seems to be infected with *C. burnetii* very rarely. Occasional reports of successful isolation of *C. burnetii* from field-collected *I. ricinus* support the theory of less relevance in Q fever transmission (132). In the past, a correlation was presumed between the occurrence of Q fever and the abundance of *Dermacentor marginatus* (133). Considering the low prevalence in this species, this theory was not proven by the data collected here from the analyzed studies. However, there seems to be an association of *C. burnetii* with ticks of the genus *Hyalomma* spp. and *Rhipicephalus* spp., naturally present in regions with ambient temperatures, e.g., the Mediterranean region. This is also supported by the *in vivo* experimental study performed with *H. aegyptium* (108). As *Rhipicephalus* spp. is highly infected with CLE, positive results should be confirmed by sequencing (41, 119).

Prevalence studies targeting *C. burnetii* in ticks are conducted worldwide, and positive ticks were found on all continents except Antarctica (134–138). Comparably with European studies, there are divergent findings in the different investigations. Recently, a study conducted in China using 16S rRNA sequencing reported



a prevalence of 40–96% depending on tested species (139). High prevalence was also found in several countries, e.g., Argentina, Egypt, or Nigeria (140–142). Apart from that, in studies in Japan or Reunion Island, no *Coxiella*-positive ticks were determined (143, 144). Despite the origin of the first isolate, *C. burnetii* is reported rarely from ticks in North America (145, 146).

### A Combination of Different Collection Methods Supports a Realistic Depiction of Reality

Different collection methods were used in the studies, but the most common is removing from animals or flagging. Simple detection of the DNA of a pathogen does not prove the vector competence of a certain tick species (92, 147). Ticks can also carry a pathogen without the ability to transmit it (93). These arthropods feed on bacteraemic/viraemic/protozoaemic animals and are likely to take up any agent circulating in the blood of the host. The slightly higher prevalence of *C. burnetii* in ticks collected from animals compared with ticks from vegetation argues in favor of such an uptake. The procedure of flagging

of questing ticks, therefore, seems to be more appropriate for information regarding the prevalence and to discriminate between the role of ticks as a reservoir or as an accidental host (148). Additionally, data about the local seroprevalence of *C. burnetii* in animal host species could be included. A combination of both origins, vegetation, and animals, might also be of interest, especially in the context of outbreak surveillance. Moreover, only exophilic and questing ticks can be obtained using the dragging method. That excludes, for example, premature life stages of *Dermacentor* spp. or preferably hunting ticks, e.g., *Hyalomma* spp. As it is known that *C. burnetii* genomes found in ticks genetically cluster with samples isolated from wildlife, the inclusion of hunted animals can increase the knowledge of potentially sylvatic cycles (149). The sampling of ticks from migratory birds can give insight into the movement of ticks and the pathogens or microbial communities they carry. Examination of avian ticks and tick-borne diseases can also help monitor the spread of these ticks and their pathogenic cargo (150). The introduced tick species might not be adapted to the climate and availability of host species in this country; therefore, its survival is unclear. Sampling on farm animals and game favors

a higher rate of adult ticks, as this life stage is more frequently feeding on larger animals (112). Examination of ticks removed from human patients also might be of interest regarding the zoonotic potential of the disease. In a study by Dubourg et al., patients showing scalp eschar were examined, and removed ticks were tested for a wide range of tick-borne pathogens. Of the 11 ticks, mainly *D. marginatus*, two carried *C. burnetii*, whereas *Rickettsia slovaca* was the most prevalent pathogen (151). Simultaneous infection of human patients with *C. burnetii* and other tick-borne pathogens were described, but it cannot be excluded that the temporal connection between the infections is random, as Q fever is endemic worldwide, and infection might have been caused by inhalation (30). To determine the significance of ticks in Q fever transmission, it might be of major interest to perform prevalence studies in areas of active Q fever outbreaks or in known *Coxiella*-positive herds. This is important to prove any association between infected animals or humans and the local arthropods. Furthermore, identification of tick life stage is important to analyze the possibility of transovarial transmission. *Coxiella burnetii* is considered one of the most relevant pathogens and should be prioritized in the examination of wildlife (152).

### Prevalence Studies Should Include Specific *C. burnetii* Detection Methods

There was no significant difference noticed between the various target genes used in the evaluated studies. The determined prevalence depends, among other things, on the sensitivity of the used target gene. Some assays, especially when using IS1111, detect lower amounts of DNA and thus are more sensitive than others. This relation can be described more precisely by the use of standardized controls such as plasmids. Because of the close genetic relationship to CLE, the high specificity of molecular methods is required. Because frequently used PCR target gene sequences, e.g., IS1111, were also detected in endosymbionts, there is a need for specific methods to distinguish between these species. This would rule out an overestimation of the dissemination of *C. burnetii* within the tick population. The majority of studies detecting commonly used target genes for the detection of *C. burnetii* did not confirm the results with sequencing. Particularly, the IS1111 fragment is a common target for *C. burnetii* detection in ticks, which is known to be less specific but highly sensitive for the pathogen (57). The specificity for detection of *C. burnetii* in tick samples is limited in all commonly used target genes; thus, the use of single targets is not recommended (56, 58). Positive results in PCR should be interpreted carefully, and sequence confirmation should be mandatory, preferably using long targets for increased specificity (56, 153). Due to low DNA yield, sequencing might not be possible. In these cases, the combination of different target genes for detection could be a valid method to minimize the risk of unspecific results. Thus, there is a need to develop specific assays for differentiation between *C. burnetii* and CLE, which might also be applicable for higher sample sizes and poor DNA yield.

### Unclear Pathogenic Potential of Coxiella-Like Endosymbionts Should Not Be Neglected

In seven studies, CLEs were detected in tick samples, mainly using sequencing of 16s rRNA. These endosymbionts are distributed in several hard and soft tick species and represent a large proportion of the microbiome of some species (33, 154). This leads to the presumption that the specificity of some molecular methods may not be sufficient to distinguish between *C. burnetii* and endosymbionts. Several *Amblyomma* spp. and *Rhipicephalus* spp. were shown to be CLE carriers in up to 100% of analyzed tick samples (41). In another study with more than 50 different tick species of hard and soft ticks, more than two-thirds of the species were found to harbor CLE (38). *Coxiella*-like endosymbionts seem to be associated with some genera, for example, *Rhipicephalus* spp. or *Ornithodoros* spp., in which CLEs were detected with a high prevalence, whereas only a few positive samples originated from *Ixodes* spp. Binetruy et al. found CLE to be present in 11 of 24 species of the genus *Amblyomma* (155). Recent phylogenetic analysis revealed a close and apparently ancient alliance between *Rhipicephalus* spp. and their CLE (156). The main survival strategy of CLE is the vertical transmission via the egg, but also horizontal transfer, possibly via co-feeding, was proven (156, 157). Recent results based on genome sequencing have shown that certain CLEs seem to have evolved from an ancestor capable of infection of immune cells (158). Hence, a loss of pathogenic potential was suggested. In contrast, *C. burnetii* was reported to have its phylogenetic origin in CLE (38).

Novel tick-borne pathogens are emerging, and as the evolution of *C. burnetii* is closely linked to endosymbionts, the possibility of other *Coxiella* spp. being pathogenic should not be neglected, considering that bird infections or human skin infections were reported (38, 49, 103, 158). Increasing the knowledge on evolutionary processes and the pathogenic potential of CLE could likewise also contribute to a better understanding of the epidemiology of *C. burnetii*.

Little is known about the impact CLE might have on pathogen transmission. A reduced infection rate of *R. haemaphysaloides* with CLE correlated with a lower rate of transstadial transmission of *Babesia microti*. *Candidatus Midichloria mitochondrii*, another tick endosymbiont, is known to influence the occurrence and ability to detect tick-borne pathogens in *I. ricinus* (159, 160).

### Experimental Studies Are Needed to Assess the Vector Competence of Further Tick Species

In the past, seven tick species were shown to be competent vectors for *C. burnetii* (28). There is little recent research exploring the vector competence of ticks under laboratory conditions. Experimental studies prove transstadial transmission and successful reinfection of guinea pigs by *H. aegyptium* ticks (108) and transstadial transmission from nymphs to adults in *I. ricinus* (98). Recently, a transstadial transmission from nymphs to adults and a subsequent excretion with saliva were concluded in naturally infected *H. lusitanicum* (161). There is a lack of vector competence studies on different tick species, focusing

on the transstadial and transovarial transmission of pathogens. However, those studies are limited by the low rate of transmission and consequently incomplete knowledge of epidemiological cycles (162). Furthermore, studies are missing, which describe the level and duration of bacteremia in *C. burnetii*-infected hosts, which are necessary to estimate the actual vector capacity under laboratory conditions. As a mainly airborne pathogen, the potential infection routes may be *via* inhalation of feces besides the injection of saliva during the tick bite (98, 108). Infected feces might also contaminate the wound and thus causing an infection, as it is known from the transmission of *Trypanosoma cruzi* by bed bugs or *Rickettsia prowazekii* and lice (163, 164).

Besides the need for information regarding the prevalence of *C. burnetii* in ticks, the risk of acquiring Q fever by a tick bite cannot finally be determined. In different studies, the correlation between coxiellosis and the abundance of ticks as a risk factor was examined. Predominantly, no significant correlation was found (165–167), whereas other investigations concluded an association between tick infestation and seroprevalence (168, 169).

Most tick species in Europe are spreading, and the increased risk of tick-borne diseases accompanies this. For this reason, extensive and focused monitoring of ticks and their microbial burden is crucial, as well as further research on possibly tick-borne diseases and the pathogenic potential of already known bacteria.

## CONCLUSIONS

The evaluation of European studies shows a significantly higher prevalence of *Coxiella* spp. in ticks in Mediterranean countries. This is likely to be driven by the abundance of different tick species in these countries, i.e., *Hyalomma* spp. and *Rhipicephalus* spp. In the context of global warming, the geographical distribution of these tick species changes and thus the epidemiology of Q fever in currently temperate Europe. Based on the large number of studies, which failed to detect *C. burnetii* DNA in tick samples, ticks carrying *C. burnetii* seem to be restricted to certain regions. Positive results have to be interpreted carefully because no distinction between *C. burnetii* and CLE was made in most of these studies. Planning of a prevalence study on ticks should, therefore, in particular,

focus on the choice of detection methods for specific results. Methods should aim to differentiate *C. burnetii* and CLE using sequencing or at least to use different target genes in positive samples.

To address the questions on the role ticks play as a reservoir in Q fever transmission, vector competence studies using different and relevant tick species should be performed.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

SK and KM-S designed the study, SK conducted the literature search, SK, GM, SU, MP, and KM-S performed the data extraction, and SK analyzed the data and drafted the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

This study was supported by the German Federal Ministry for Education and Research (BMBF) *via* the Research Network of Zoonotic Infectious Diseases, project Q-GAPS (Q fever—German Interdisciplinary Program for Research), grant numbers 01KI1726G and 01KI1726C, and project TBENAGER (Tick-Borne Encephalitis in Germany), grant number 01KI1728D.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.655715/full#supplementary-material>

**Supplementary Figure 1** | Forest plots of the included prevalence studies.

**Supplementary Table 1** | Overview on included prevalence studies and the collected data.

## REFERENCES

- van Roeden SE, Wever PC, Kampschreur LM, Gruteke P, van der Hoek W, Hoepelman AIM, et al. Chronic Q fever-related complications and mortality: data from a nationwide cohort. *Clin Microbiol Infect.* (2019) 25:1390–8. doi: 10.1016/j.cmi.2018.11.023
- van Asseldonk MAPM, Prins J, Bergevoet RHM. Economic assessment of Q fever in the Netherlands. *Prev Vet Med.* (2013) 112:27–34. doi: 10.1016/j.prevetmed.2013.06.002
- Baca OG, Li YP, Kumar H. Survival of the Q fever agent *Coxiella burnetii* in the phagolysosome. *Trends Microbiol.* (1994) 2:476–80. doi: 10.1016/0966-842x(94)90651-3
- Melenotte C, Lepidi H, Nappes C, Bechah Y, Audoly G, Terras J, et al. Mouse model of *Coxiella burnetii* aerosolization. *Infect Immun.* (2016) 84:2116–23. doi: 10.1128/iai.00108-16
- Arricau Bouvery N, Souriau A, Lechopier P, Rodolakis A. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Vet Res.* (2003) 34:423–33. doi: 10.1051/vetres:2003017
- Roest HI, van Solt CB, Tilburg JJ, Klaassen CH, Hovius EK, Roest FT, et al. Search for possible additional reservoirs for human Q fever, The Netherlands. *Emerg Infect Dis.* (2013) 19:834–5. doi: 10.3201/eid1905.121489
- Roest H-J, van Gelderen B, Dinkla A, Frangoulidis D, van Zijderveld F, Rebel J, et al. Q fever in pregnant goats: pathogenesis and excretion of *Coxiella burnetii*. *PLoS ONE.* (2012) 7:e48949. doi: 10.1371/journal.pone.0048949
- Guatteo R, Joly A, Beaudeau F. Shedding and serological patterns of dairy cows following abortions associated with *Coxiella burnetii* DNA detection. *Vet Microbiol.* (2012) 155:430–3. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.09.026
- Groten T, Kuenzer K, Moog U, Hermann B, Maier K, Boden K. Who is at risk of occupational Q fever: new insights from a multi-profession cross-sectional study. *BMJ Open.* (2020) 10:e030088. doi: 10.1136/bmjopen-2019-030088

10. Schimmer B, Schotten N, van Engelen E, Hautvast JL, Schneeberger PM, van Duijnhoven YT. *Coxiella burnetii* seroprevalence and risk for humans on dairy cattle farms, the Netherlands, 2010–2011. *Emerg Infect Dis.* (2014) 20:417–25. doi: 10.3201/eid2003.131111
11. Evstigneeva AS, Ulyanova TY, Tarasevich IV. The survival of *Coxiella burnetii* in soils. *Euras Soil Sci.* (2007) 40:565–8. doi: 10.1134/S1064229307050122
12. Cutler SJ, Bouzid M, Cutler RR. Q fever. *J Infect.* (2007) 54:313–8. doi: 10.1016/j.jinf.2006.10.048
13. To H, Htwe KK, Kako N, Kim HJ, Yamaguchi T, Fukushi H, et al. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle with reproductive disorders. *J Vet Med Sci.* (1998) 60:859–61. doi: 10.1292/jvms.60.859
14. Macías-Rioseco M, Riet-Correa F, Miller MM, Sondgeroth K, Fraga M, Silveira C, et al. Bovine abortion caused by *Coxiella burnetii*: report of a cluster of cases in Uruguay and review of the literature. *J Vet Diagn Invest.* (2019) 31:634–9. doi: 10.1177/1040638719856394
15. van der Hoek W, Morroy G, Renders NH, Wever PC, Hermans MH, Leenders AC, et al. Epidemic Q fever in humans in the Netherlands. *Adv Exp Med Biol.* (2012) 984:329–64. doi: 10.1007/978-94-007-4315-1\_17
16. Schneeberger PM, Wintenberg C, van der Hoek W, Stahl JP. Q fever in the Netherlands – 2007–2010: what we learned from the largest outbreak ever. *Med Mal Infect.* (2014) 44:339–53. doi: 10.1016/j.medmal.2014.02.006
17. Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev.* (1999) 12:518–53. doi: 10.1128/CMR.12.4.518
18. Kampschreur LM, Delsing CE, Groenwold RH, Wegdam-Blans MC, Bleeker-Rovers CP, de Jager-Leclercq MG, et al. Chronic Q fever in the Netherlands 5 years after the start of the Q fever epidemic: results from the Dutch chronic Q fever database. *J Clin Microbiol.* (2014) 52:1637–43. doi: 10.1128/jcm.03221-13
19. van Roeden SE, Bleeker-Rovers CP, de Regt MJA, Kampschreur LM, Hoepelman AIM, Wever PC, et al. Treatment of chronic Q Fever: clinical efficacy and toxicity of antibiotic regimens. *Clin Infect Dis.* (2018) 66:719–26. doi: 10.1093/cid/cix886
20. Kampschreur LM, Wegdam-Blans MC, Thijsen SF, Groot CA, Schneeberger PM, Hollander AA, et al. Acute Q fever related in-hospital mortality in the Netherlands. *Neth J Med.* (2010) 68:408–13.
21. Davis GE, Cox HR, Parker RR, Dyer RE. A filter-passing infectious agent isolated from ticks. *Public Health Reports (1896–1970)* (1938) 53:2259–82. doi: 10.2307/4582746
22. Smith DJW. Studies in the epidemiology of Q fever. 8. The transmission of Q fever by the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Aust J Exp Biol Med.* (1941) 19:133–6. doi: 10.1038/icb.1941.21
23. Smith DJW. Studies in the epidemiology of Q fever. 11. Experimental infection of the ticks *Haemaphysalis bispinosa* and *Ornithodoros* sp. with *Rickettsia burnetii*. *Aust J Exp Biol Med Sci.* (1942) 20:295–6. doi: 10.1038/icb.1942.47
24. Philip CB. Observations on experimental Q fever. *J Parasitol.* (1948) 34:457–64. doi: 10.2307/3273312
25. Smith DJW. Studies in the epidemiology of Q fever. 3. Transmission of Q fever by the tick *Haemaphysalis humerosa*. *Aust J Exp Biol Med Sci.* (1940) 18:103–18. doi: 10.1038/icb.1940.11
26. Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, et al. From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change. *Clin Microbiol Rev.* (2017) 30:115–90. doi: 10.1128/cmr.00045-16
27. Rehacek J, Brezina R. Detection of *Coxiella burnetii* in saliva of experimentally infected ticks, *Hyalomma dromedarii* Koch. *Bull World Health Organ.* (1968) 39:974–7.
28. Duron O, Sidi-Boumedine K, Rousset E, Moutailler S, Jourdain E. The importance of ticks in Q Fever transmission: what has (and has not) been demonstrated? *Trends Parasitol.* (2015) 31:536–52. doi: 10.1016/j.pt.2015.06.014
29. Nett R, Book E, Anderson A. Q Fever with unusual exposure history: a classic presentation of a commonly misdiagnosed disease. *Case Rep. Infect. Dis.* (2012) 2012:916142. doi: 10.1155/2012/916142
30. Rolain JM, Gouriet F, Brouqui P, Larrey D, Janbon F, Vene S, et al. Concomitant or consecutive infection with *Coxiella burnetii* and tickborne diseases. *Clin Infect Dis.* (2005) 40:82–8. doi: 10.1086/426440
31. Duron O, Hurst GD. Arthropods and inherited bacteria: from counting the symbionts to understanding how symbionts count. *BMC Biol.* (2013) 11:45. doi: 10.1186/1741-7007-11-45
32. Noda H, Munderloh UG, Kurtti TJ. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. *Appl Environ Microbiol.* (1997) 63:3926–32. doi: 10.1128/aem.63.10.3926-3932.1997
33. Zhong J. *Coxiella*-like endosymbionts. *Adv Exp Med Biol.* (2012) 984:365–79. doi: 10.1007/978-94-007-4315-1\_18
34. Seo MG, Lee SH, VanBik D, Ouh IO, Yun SH, Choi E, et al. Detection and genotyping of *Coxiella burnetii* and *Coxiella*-like bacteria in horses in South Korea. *PLoS ONE.* (2016) 11:e0156710. doi: 10.1371/journal.pone.0156710
35. Gottlieb Y, Lalzar I, Klasson L. Distinctive genome reduction rates revealed by genomic analyses of two *Coxiella*-like endosymbionts in ticks. *Genome Biol Evol.* (2015) 7:1779–96. doi: 10.1093/gbe/evv108
36. Ramaiah A, Dasch GA. Genome sequence of *Coxiella*-like endosymbiont strain CLE-RmD, a bacterial agent in the cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) Deutsch strain. *Genome Announc.* (2018) 6:e00003–18. doi: 10.1128/genomeA.00003-18
37. Tsementzi D, Castro Gordillo J, Mahagna M, Gottlieb Y, Konstantinidis KT. Comparison of closely related, uncultivated *Coxiella* tick endosymbiont population genomes reveals clues about the mechanisms of symbiosis. *Environ Microbiol.* (2018) 20:1751–64. doi: 10.1111/1462-2920.14104
38. Duron O, Noel V, McCoy KD, Bonazzi M, Sidi-Boumedine K, Morel O, et al. The recent evolution of a maternally-inherited endosymbiont of ticks led to the emergence of the Q fever pathogen, *Coxiella burnetii*. *PLoS Pathog.* (2015) 11:e1004892. doi: 10.1371/journal.ppat.1004892
39. Ben-Yosef M, Rot A, Mahagna M, Kapri E, Behar A, Gottlieb Y. *Coxiella*-like endosymbiont of *Rhipicephalus sanguineus* is required for physiological processes during ontogeny. *Front Microbiol.* (2020) 11:493. doi: 10.3389/fmicb.2020.00493
40. Smith TA, Driscoll T, Gillespie JJ, Raghavan R. A *Coxiella*-like endosymbiont is a potential vitamin source for the Lone Star tick. *Genome Biol Evol.* (2015) 7:831–8. doi: 10.1093/gbe/evv016
41. Machado-Ferreira E, Vizzoni VF, Balsemão-Pires E, Moerbeck L, Gazeta GS, Piesman J, et al. *Coxiella* symbionts are widespread into hard ticks. *Parasitol Res.* (2016) 115:4691–9. doi: 10.1007/s00436-016-5230-z
42. Duron O, Morel O, Noël V, Buysse M, Binetruy F, Lancelot R, et al. Tick-bacteria mutualism depends on B vitamin synthesis pathways. *Curr Biol.* (2018) 28:1896–902.e5. doi: 10.1016/j.cub.2018.04.038
43. Zhang CM, Li NX, Zhang TT, Qiu ZX, Li Y, Li LW, et al. Endosymbiont CLS-HI plays a role in reproduction and development of *Haemaphysalis longicornis*. *Exp Appl Acarol.* (2017) 73:429–38. doi: 10.1007/s10493-017-0194-y
44. Li LH, Zhang Y, Zhu D. Effects of antibiotic treatment on the fecundity of *Rhipicephalus haemaphysaloides* ticks. *Parasit Vec.* (2018) 11:242. doi: 10.1186/s13071-018-2807-7
45. Guizzo MG, Parizi LF, Nunes RD, Schama R, Albano RM, Tirloni L, et al. A *Coxiella* mutualist symbiont is essential to the development of *Rhipicephalus microplus*. *Sci Rep.* (2017) 7:17554. doi: 10.1038/s41598-017-17309-x
46. Vapniarsky N, Barr BC, Murphy B. Systemic *Coxiella*-like infection with myocarditis and hepatitis in an eclectus parrot (*Eclectus roratus*). *Vet Pathol.* (2012) 49:717–22. doi: 10.1177/0300985811409251
47. Woc-Colburn AM, Garner MM, Bradway D, West G, D'Agostino J, Trupkiewicz J, et al. Fatal coxiellosis in Swainson's Blue Mountain Rainbow Lorikeets (*Trichoglossus haematodus moluccanus*). *Vet Pathol.* (2008) 45:247–54. doi: 10.1354/vp.45-2-247
48. Flanders AJ, Rosenberg JF, Bercier M, Leissing MK, Black LJ, Giglio RF, et al. Antemortem diagnosis of coxiellosis in a Blue and Gold Macaw (*Ara ararauna*). *J Avian Med Surg.* (2017) 31:364–72. doi: 10.1647/2016-224
49. Angelakis E, Mediannikov O, Jos SL, Berenger JM, Parola P, Raoult D. *Candidatus Coxiella massiliensis* infection. *Emerg Infect Dis.* (2016) 22:285–8. doi: 10.3201/eid2202.150106
50. Reháček J, Brezina R, Kováčová E, Zupancicová M. Haemocyte test-an easy, quick and reliable method for the detection of *rickettsiae* in ticks. *Acta Virol.* (1971) 15:237–40.

51. Reháček J, Zupanicová M, Ac P, Tarasevich IV, Jablonskaja VA, Pospisil R, et al. Rickettsioses studies. 2. Natural foci of rickettsioses in east Slovakia. *Bull World Health Organ.* (1976) 53:31–8.
52. Reháček J, Kováčová E, Lisák V, Rumin W. Occurrence of *Coxiella burnetii*, *Rickettsia slovaca*, and organisms resembling bacillary rickettsiae in their natural foci in Slovakia 20 years after their first detection. *Folia Parasitol (Praha)* (1990) 37:285–6.
53. Klee SR, Tycza J, Ellerbrok H, Franz T, Linke S, Baljer G, et al. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiol.* (2006) 6:2. doi: 10.1186/1471-2180-6-2
54. Brennan RE, Samuel JE. Evaluation of *Coxiella burnetii* antibiotic susceptibilities by real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* (2003) 41:1869–74. doi: 10.1128/jcm.41.5.1869-1874.2003
55. Stein A, Raoult D. Detection of *Coxiella burnetii* by DNA amplification using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* (1992) 30:2462–6. doi: 10.1128/jcm.30.9.2462-2466.1992
56. Jourdain E, Duron O, Severine B, Gonzalez-Acuna D, Sidi-Boumedine K. Molecular methods routinely used to detect *Coxiella burnetii* in ticks cross-react with *Coxiella*-like bacteria. *Infect Ecol Epidemiol.* (2015) 5:29230. doi: 10.3402/iee.v5.29230
57. Duron O. The IS1111 insertion sequence used for detection of *Coxiella burnetii* is widespread in *Coxiella*-like endosymbionts of ticks. *FEMS Microbiol Lett.* (2015) 362:fnv132. doi: 10.1093/femsle/fnv132
58. Reeves WK, Loftis AD, Sanders F, Spinks MD, Wills W, Denison AM, et al. *Borrelia*, *Coxiella*, and *Rickettsia* in *Carios capensis* (Acari: Argasidae) from a brown pelican (*Pelecanus occidentalis*) rookery in South Carolina, USA. *Exp Appl Acarol.* (2006) 39:321–9. doi: 10.1007/s10493-006-9012-7
59. Duron O, Jourdain E, McCoy KD. Diversity and global distribution of the *Coxiella* intracellular bacterium in seabird ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* (2014) 5:557–63. doi: 10.1016/j.ttbdis.2014.04.003
60. Estrada-Peña A, Mihalca AD, Petney, TN. *Ticks of Europe and North Africa: A Guide to Species Identification*. Basel: Springer International Publishing (2017). p. 404.
61. Duron O, Binetruy F, Noël V, Cremaschi J, McCoy KD, Arnathau C, et al. Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. *Mol Ecol.* (2017) 26:2905–21. doi: 10.1111/mec.14094
62. Rizzoli A, Silaghi C, Obiegala A, Rudolf I, Hubálek Z, Földvári G, et al. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. *Front Public Health.* (2014) 2:251. doi: 10.3389/fpubh.2014.00251
63. Rubel F, Brugger K, Pfeffer M, Chitima-Dobler I, Didyk YM, Leverenz S, et al. Geographical distribution of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* in Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* (2016) 7:224–33. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.10.015
64. Chitima-Dobler L, Schaper S, Rieß R, Bitterwolf K, Frangoulidis D, Bestehorn M, et al. Imported *Hyalomma* ticks in Germany in 2018. *Parasit Vectors.* (2019) 12:134. doi: 10.1186/s13071-019-3380-4
65. Duscher GG, Hodžič A, Hufnagl P, Wille-Piazzi W, Schötta AM, Markowicz MA, et al. Adult *Hyalomma marginatum* tick positive for *Rickettsia aeschlimannii* in Austria, October 2018. *Euro Surveill.* (2018) 23:1800595. doi: 10.2807/1560-7917.Es.2018.23.48.1800595
66. Dantas-Torres F, Lia RP, Capelli G, Otranto D. Efficiency of flagging and dragging for tick collection. *Exp Appl Acarol.* (2013) 61:119–27. doi: 10.1007/s10493-013-9671-0
67. Tack W, Madder M, De Frenne P, Vanhellefont M, Gruwez R, Verheyen K. The effects of sampling method and vegetation type on the estimated abundance of *Ixodes ricinus* ticks in forests. *Exp Appl Acarol.* (2011) 54:285–92. doi: 10.1007/s10493-011-9444-6
68. Schulz M, Mahling M, Pfister R. Abundance and seasonal activity of questing *Ixodes ricinus* ticks in their natural habitats in southern Germany in 2011. *J Vector Ecol.* (2014) 39:56–65. doi: 10.1111/j.1948-7134.2014.12070.x
69. Randolph SE, Green RM, Hoodless AN, Peacey MF. An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *Int J Parasitol.* (2002) 32:979–89. doi: 10.1016/s0020-7519(02)00030-9
70. Sherif K, Rexhepi A, Berxholi K, Mehmedi B, Gecaj RM, Hoxha Z, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from Kosovo and Albania. *Front Vet Sci.* (2018) 5:38. doi: 10.3389/fvets.2018.00038
71. United Nations Statistics Division. (1999). Available online at: <https://unstats.un.org/unsd/methodology/m49/> (accessed November 26, 2020).
72. Mancini F, Di Luca M, Toma L, Vescio F, Bianchi R, Khoury C, et al. Prevalence of tick-borne pathogens in an urban park in Rome, Italy. *Ann Agric Environ Med.* (2014) 21:723–7. doi: 10.5604/12321966.1129922
73. Minichová L, Hamšíková Z, Mahriková L, Slovák M, Kocianová E, Kazimirová M, et al. Molecular evidence of *Rickettsia* spp. in ixodid ticks and rodents in suburban, natural and rural habitats in Slovakia. *Parasit Vec.* (2017) 10:158. doi: 10.1186/s13071-017-2094-8
74. Satta G, Chisu V, Cabras P, Fois F, Masala G. Pathogens and symbionts in ticks: a survey on tick species distribution and presence of tick-transmitted micro-organisms in Sardinia, Italy. *J Med Microbiol.* (2011) 60(Pt 1):63–8. doi: 10.1099/jmm.0.021543-0
75. Grech-Angelini S, Stachurski F, Vayssier-Taussat M, Devillers E, Casabianca F, Lancelot R, et al. Tick-borne pathogens in ticks (Acari: Ixodidae) collected from various domestic and wild hosts in Corsica (France), a Mediterranean island environment. *Transbound Emerg Dis.* (2020) 67:745–57. doi: 10.1111/tbed.13393
76. Chisu V, Foxi C, Mannu R, Satta G, Masala G. A five-year survey of tick species and identification of tick-borne bacteria in Sardinia, Italy. *Ticks Tick Borne Dis.* (2018) 9:678–81. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.02.008
77. Pascucci I, Di Domenico M, Capobianco Dondona G, Di Gennaro A, Polci A, Capobianco Dondona A, et al. Assessing the role of migratory birds in the introduction of ticks and tick-borne pathogens from African countries: an Italian experience. *Ticks Tick Borne Dis.* (2019) 10:101272. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.10.1272
78. Pilloux L, Baumgartner A, Jaton K, Lienhard R, Ackermann-Gaumann R, Beuret C, et al. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Coxiella burnetii* in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland: an underestimated epidemiologic risk. *New Microbes New Infect.* (2019) 27:22–6. doi: 10.1016/j.nmni.2018.08.017
79. González J, González MG, Valcárcel F, Sánchez M, Martín-Hernández R, Tercero JM, et al. Prevalence of *Coxiella burnetii* (Legionellales: Coxiellaceae) infection among wildlife species and the tick *Hyalomma lusitanicum* (Acari: Ixodidae) in a meso-Mediterranean ecosystem. *J Med Entomol.* (2020) 57:551–6. doi: 10.1093/jme/tjz169
80. Knap N, Zele D, Glinsek Biskup U, Avsic-Zupanc T, Vengust G. The prevalence of *Coxiella burnetii* in ticks and animals in Slovenia. *BMC Vet Res.* (2019) 15:368. doi: 10.1186/s12917-019-2130-3
81. Berthová L, Slobodník V, Slobodník R, Olekšák M, Sekeyová Z, Svitálková Z, et al. The natural infection of birds and ticks feeding on birds with *Rickettsia* spp. and *Coxiella burnetii* in Slovakia. *Exp Appl Acarol.* (2016) 68:299–314. doi: 10.1007/s10493-015-9975-3
82. Tokarevich NK, Panferova YA, Freylikhman OA, Blinova OV, Medvedev SG, Mironov SV, et al. *Coxiella burnetii* in ticks and wild birds. *Ticks Tick Borne Dis.* (2019) 10:377–85. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.11.020
83. Wallmenius K, Pettersson JH, Jaenson TG, Nilsson K. Prevalence of *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Coxiella burnetii* in adult *Ixodes ricinus* ticks from 29 study areas in central and southern Sweden. *Ticks Tick Borne Dis.* (2012) 3:100–6. doi: 10.1016/j.ttbdis.2011.11.003
84. Quarsten H, Skarpaas T, Fajs L, Noraas S, Kjelland V. Tick-borne bacteria in *Ixodes ricinus* collected in southern Norway evaluated by a commercial kit and established real-time PCR protocols. *Ticks Tick Borne Dis.* (2015) 6:538–44. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.04.008
85. Michelet L, Delannoy S, Devillers E, Umhang G, Aspan A, Juremalm M, et al. High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Front Cell Infect Microbiol.* (2014) 4:103. doi: 10.3389/fcimb.2014.00103
86. Tijssen-Klasen E, Hansford KM, Jahfari S, Phipps P, Sprong H, Medlock JM. Spotted fever group rickettsiae in *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis punctata* ticks in the UK. *Parasit Vec.* (2013) 6:212. doi: 10.1186/1756-3305-6-212
87. Mancini F, Vescio MF, Toma L, Di Luca M, Severini F, Caccio SM, et al. Detection of tick-borne pathogens in ticks collected in the suburban area of Monte Romano, Lazio Region, Central Italy. *Ann Ist Super Sanita.* (2019) 55:143–50. doi: 10.4415/ann\_19\_02\_06

88. Toma L, Mancini F, Di Luca M, Cecere JG, Bianchi R, Khoury C, et al. Detection of microbial agents in ticks collected from migratory birds in central Italy. *Vector Borne Zoon. Dis.* (2014) 14:199–205. doi: 10.1089/vbz.2013.1458
89. Desjardins I, Joulié A, Pradier S, Lecollinet S, Beck C, Vial L, et al. Seroprevalence of horses to *Coxiella burnetii* in an Q fever endemic area. *Vet Microbiol.* (2018) 215:49–56. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.11.012
90. Toledo A, Jado I, Olmeda AS, Casado-Nistal MA, Gil H, Escudero R, et al. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected from Central Spain. *Vector Borne Zoon. Dis.* (2009) 9:465–8. doi: 10.1089/vbz.2008.0070
91. Spitalska E, Kocianova E. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected in Slovakia and Hungary. *Eur J Epidemiol.* (2003) 18:263–6. doi: 10.1023/a:1023330222657
92. Bonnet S, de la Fuente J, Nicolle P, Liu X, Madani N, Blanchard B, et al. Prevalence of tick-borne pathogens in adult *Dermacentor* spp. ticks from nine collection sites in France. *Vector Borne Zoon. Dis.* (2013) 13:226–36. doi: 10.1089/vbz.2011.0933
93. Varela-Castro L, Zuddas C, Ortega N, Serrano E, Salinas J, Castellà J, et al. On the possible role of ticks in the eco-epidemiology of *Coxiella burnetii* in a Mediterranean ecosystem. *Ticks Tick Borne Dis.* (2018) 9:687–94. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.02.014
94. Santos-Silva MM, Melo P, Santos N, Antunes S, Duarte LR, Ferrolho J, et al. PCR screening of tick-borne agents in sensitive conservation areas, Southeast Portugal. *Mol Cell Probes.* (2017) 31:42–5. doi: 10.1016/j.mcp.2016.11.005
95. Chaligiannis I, Fernandez de Mera IG, Papa A, Sotiraki S, de la Fuente J. Molecular identification of tick-borne pathogens in ticks collected from dogs and small ruminants from Greece. *Exp Appl Acarol.* (2018) 74:443–53. doi: 10.1007/s10493-018-0237-z
96. Santos AS, de Bruin A, Veloso AR, Marques C, Pereira da Fonseca I, de Sousa R, et al. Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Candidatus Neoehrlichia* sp., *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. in questing ticks from a recreational park, Portugal. *Ticks Tick Borne Dis.* (2018) 9:1555–64. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.07.010
97. Chisu V, Loi F, Foxi C, Chessa G, Masu G, Rolesu S, et al. Coexistence of tick-borne pathogens in ticks collected from their hosts in Sardinia: an update. *Acta Parasitol.* (2020). doi: 10.1007/s11686-020-00240-z
98. Körner S, Makert GR, Mertens-Scholz K, Henning K, Pfeffer M, Starke A, et al. Uptake and fecal excretion of *Coxiella burnetii* by *Ixodes ricinus* and *Dermacentor marginatus* ticks. *Parasit Vec.* (2020) 13:75. doi: 10.1186/s13071-020-3956-z
99. Papa A, Tsioka K, Kontana A, Papadopoulos C, Giadinis N. Bacterial pathogens and endosymbionts in ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* (2017) 8:31–5. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.09.011
100. Sprong H, Fonville M, Docters van Leeuwen A, Devillers E, Ibañez-Justicia A, Stroo A, et al. Detection of pathogens in *Dermacentor reticulatus* in northwestern Europe: evaluation of a high-throughput array. *Heliyon.* (2019) 5:e01270. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01270
101. Tomanovic S, Chochlakis S, Radulovic Z, Milutinovic M, Cacic S, Mihaljica D, et al. Analysis of pathogen co-occurrence in host-seeking adult hard ticks from Serbia. *Exp Appl Acarol.* (2013) 59:367–76. doi: 10.1007/s10493-012-9597-y
102. Spitalska E, Sparagano O, Stanko M, Schwarzova K, Spitalsky Z, Skultety L, et al. Diversity of *Coxiella*-like and *Francisella*-like endosymbionts, and *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii* as pathogens in the tick populations of Slovakia, Central Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* (2018) 9:1207–11. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.05.002
103. Zhang Y-K, Yu Z-J, Wang D, Bronislava V, Branislav P, Liu J-Z. The bacterial microbiome of field-collected *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* from Slovakia. *Parasit Vec.* (2019) 12:325. doi: 10.1186/s13071-019-3582-9
104. Spitalska E, Kocianova E. Tick-borne microorganisms in southwestern Slovakia. *Ann N Y Acad Sci.* (2003) 990:196–200. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07362.x
105. Spitalská E, Kocianová E, Výrosteková V. Natural focus of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* of spotted fever group in southwestern Slovakia. *Biologia.* (2002) 57:585–91.
106. Barandika JF, Hurtado A, Garcia-Sanmartin J, Juste RA, Anda P, Garcia-Perez AL. Prevalence of tick-borne zoonotic bacteria in questing adult ticks from northern Spain. *Vector Borne Zoon. Dis.* (2008) 8:829–35. doi: 10.1089/vbz.2008.0023
107. Pa'tiu AI, Matei IA, Mihalca AD, D'Amico G, Dumitrache MO, Kalmár Z, et al. Zoonotic pathogens associated with *Hyalomma aegyptium* in endangered tortoises: evidence for host-switching behaviour in ticks? *Parasit Vec.* (2012) 5:301. doi: 10.1186/1756-3305-5-301
108. Siroky P, Kubelova M, Modry D, Erhart J, Literak I, Spitalska E, et al. Tortoise tick *Hyalomma aegyptium* as long term carrier of Q fever agent *Coxiella burnetii* - evidence from experimental infection. *Parasitol Res.* (2010) 107:1515–20. doi: 10.1007/s00436-010-2037-1
109. Pascucci I, Di Domenico M, Dall'Acqua F, Sozio G, Cammà C. Detection of Lyme disease and Q Fever agents in wild rodents in Central Italy. *Vector Borne Zoon. Dis.* (2015) 15:404–11. doi: 10.1089/vbz.2015.1807
110. Vila A, Estrada-Peña A, Altet L, Cusco A, Dandrea S, Francino O, et al. Endosymbionts carried by ticks feeding on dogs in Spain. *Ticks Tick Borne Dis.* (2019) 10:848–52. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.04.003
111. Sprong H, Tijssse-Klasen E, Langelaar M, De Bruin A, Fonville M, Gassner F, et al. Prevalence of *Coxiella burnetii* in ticks after a large outbreak of Q fever. *Zoon Publ Health.* (2012) 59:69–75. doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01421.x
112. Reye AL, Stegny V, Mishaeva NP, Velhin S, Hubschen 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:e54476. doi: 10.1371/journal.pone.0054476
113. Smetanová K, Schwarzová K, Kocianová E. Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., and *Borrelia burgdorferi* s. l. in ticks, and wild-living animals in western and middle Slovakia. *Ann N Y Acad Sci.* (2006) 1078:312–5. doi: 10.1196/annals.1374.058
114. Szymanska-Czerwinska M, Galinska EM, Niemczuk K, Zasepa M. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in foresters and ticks in the south-eastern Poland and comparison of diagnostic methods. *Ann Agric Environ Med.* (2013) 20:699–704. Available online at: <http://www.aagem.pl/Prevalence-of-Coxiella-burnetii-infection-in-foresters-in-the-south-eastern-Poland,72000,0,2.html>
115. Kazimirová M, Hamsíková Z, Špitálská E, Minichová L, Mahriková L, Caban R, et al. Diverse tick-borne microorganisms identified in free-living ungulates in Slovakia. *Parasit Vect.* (2018) 11:495. doi: 10.1186/s13071-018-3068-1
116. Bielawska-Drozd A, Cieslik P, Zakowska D, Glowacka P, Wlizo-Skowronek B, Zieba P, et al. Detection of *Coxiella burnetii* and *Francisella tularensis* in tissues of wild-living animals and in ticks of north-west Poland. *Pol J Microbiol.* (2018) 67:529–34. doi: 10.21307/pjm-2018-059
117. Hildebrandt A, Franke J, Schmook G, Pauliks K, Krämer A, Straube E. Diversity and coexistence of tick-borne pathogens in Central Germany. *J Med Entomol.* (2011) 48:651–5. doi: 10.1603/ME10254
118. Schabereiter-Gurtner C, Lubitz W, Rölleke S. Application of broad-range 16S rRNA PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of tick-infecting bacteria. *J Microbiol Methods.* (2003) 52:251–60. doi: 10.1016/s0167-7012(02)00186-0
119. Raele DA, Galante D, Pugliese N, De Simone E, Cafiero MA. *Coxiella*-like endosymbiont associated to the “Anatolian brown tick” *Rhipicephalus bursa* in Southern Italy. *Microbes Infect.* (2015) 17:799–805. doi: 10.1016/j.micinf.2015.09.011
120. Socolovschi C, Reynaud P, Kernif T, Raoult D, Parola P. *Rickettsia* of spotted fever group, *Borrelia valaisiana*, and *Coxiella burnetii* in ticks on passerine birds and mammals from the Camargue in the south of France. *Ticks Tick Borne Dis.* (2012) 3:355–60. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.10.019
121. Bogunovic D, Stević N, Sidi-Boumedine K, Misić D, Tomanović S, Kulišić Z, et al. Molecular evidence of Q Fever agent *Coxiella burnetii* in ixodid ticks collected from stray dogs in Belgrade (Serbia). *Acta Veterin.* (2018) 68:257–68. doi: 10.2478/acve-2018-0023
122. Bernasconi MV, Casati S, Peter O, Piffaretti JC. *Rhipicephalus* ticks infected with *Rickettsia* and *Coxiella* in Southern Switzerland (Canton Ticino). *Infect Genet Evol.* (2002) 2:111–20. doi: 10.1016/s1567-1348(02)00092-8
123. Beltrame A, Laroche M, Degani M, Perandin F, Bisoffi Z, Raoult D, et al. Tick-borne pathogens in removed ticks Veneto, northeastern Italy:

- a cross-sectional investigation. *Travel Med Infect Dis.* (2018) 26:58–61. doi: 10.1016/j.tmaid.2018.08.008
124. Kalmár Z, Dumitrache M, d'amico G, Matei I, Ionică A, Gherman C, et al. Multiple tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks collected from humans in Romania. *Pathogens.* (2020) 9:390. doi: 10.3390/pathogens9050390
  125. Pajoro M, Pistone D, Varotto Boccazzi I, Mereghetti V, Bandi C, Fabbi M, et al. Molecular screening for bacterial pathogens in ticks (*Ixodes ricinus*) collected on migratory birds captured in northern Italy. *Folia Parasitol (Praha).* (2018) 65:2018.008. doi: 10.14411/fp.2018.008
  126. Henning K, Greiner-Fischer S, Hotzel H, Ebsen M, Theegarten D. Isolation of *Spiroplasma* sp. from an *Ixodes* tick. *Int J Med Microbiol.* (2006) 296(Suppl 40):157–61. doi: 10.1016/j.ijmm.2006.01.012
  127. 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. *Parasit Vectors.* (2018) 11:144. doi: 10.1186/s13071-018-2756-1
  128. Williams HW, Cross DE, Crump HL, Drost CJ, Thomas CJ. Climate suitability for European ticks: assessing species distribution models against null models and projection under AR5 climate. *Parasit Vectors.* (2015) 8:440. doi: 10.1186/s13071-015-1046-4
  129. Wallenhammar A, Lindqvist R, Asghar N, Gunaltay S, Fredlund H, Davidsson Å, et al. Revealing new tick-borne encephalitis virus foci by screening antibodies in sheep milk. *Parasit Vectors.* (2020) 13:185. doi: 10.1186/s13071-020-04030-4
  130. Zeman P. Objective assessment of risk maps of tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis based on spatial patterns of located cases. *Int J Epidemiol.* (1997) 26:1121–9. doi: 10.1093/ije/26.5.1121
  131. Pluta S, Hartelt K, Oehme R, Mackenstedt U, Kimmig P. Prevalence of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. in ticks and rodents in southern Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* (2010) 1:145–7. doi: 10.1016/j.ttbdis.2010.04.001
  132. Rehacek J, Kaaserer B, Urvolgyi J, Lukacova M, Kovacova E, Kocianova E. Isolation of *Coxiella burnetii* and of an unknown rickettsial organism from *Ixodes ricinus* ticks collected in Austria. *Eur J Epidemiol.* (1994) 10:719–23. doi: 10.1007/bf01719288
  133. Liebisch A. Das Q-Fieber als Naturherdinfektion in Süddeutschland. *Bundesgesundheitsblatt.* (1977) 20:185–91.
  134. Cooper A, Stephens J, Ketheesan N, Govan B. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in wildlife and ticks in northern Queensland, Australia. *Vector Borne Zoon Dis.* (2013) 13:12–6. doi: 10.1089/vbz.2011.0853
  135. Davoust B, Marié JL, Pommier de Santi V, Berenger JM, Edouard S, Raoult D. Three-toed sloth as putative reservoir of *Coxiella burnetii*, Cayenne, French Guiana. *Emerg Infect Dis.* (2014) 20:1760–1. doi: 10.3201/eid2010.140694
  136. Ullah Q, El-Adawy H, Jamil T, Jamil H, Qureshi ZI, Saqib M, et al. Serological and molecular investigation of *Coxiella burnetii* in small ruminants and ticks in Punjab, Pakistan. *Int J Environ Res Public Health.* (2019) 16. doi: 10.3390/ijerph16214271
  137. Noda AA, Rodriguez I, Miranda J, Contreras V, Mattar S. First molecular evidence of *Coxiella burnetii* infecting ticks in Cuba. *Ticks Tick Borne Dis.* (2016) 7:68–70. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.08.008
  138. Hornok S, Abichu G, Meli ML, Tanczos B, Sulyok KM, Gyurancz M, et al. Influence of the biotope on the tick infestation of cattle and on the tick-borne pathogen repertoire of cattle ticks in Ethiopia. *PLoS ONE.* (2014) 9:e106452. doi: 10.1371/journal.pone.0106452
  139. Ni J, Lin H, Xu X, Ren Q, Aizezi M, Luo J, et al. *Coxiella burnetii* is widespread in ticks (Ixodidae) in the Xinjiang areas of China. *BMC Vet Res.* (2020) 16:317. doi: 10.1186/s12917-020-02538-6
  140. Loftis AD, Reeves WK, Szumlas DE, Abbassy MM, Helmy IM, Moriarity JR, et al. Rickettsial agents in Egyptian ticks collected from domestic animals. *Exp Appl Acarol.* (2006) 40:67. doi: 10.1007/s10493-006-9025-2
  141. Pacheco RC, Echaide IE, Alves RN, Beletti ME, Nava S, Labruna MB. *Coxiella burnetii* in ticks, Argentina. *Emerg Infect Dis.* (2013) 19:344–6. doi: 10.3201/eid1902.120362
  142. Reye AL, Arinola OG, Hübschen JM, Muller CP. Pathogen prevalence in ticks collected from the vegetation and livestock in Nigeria. *Appl Environ Microbiol.* (2012) 78:2562–8. doi: 10.1128/aem.06686-11
  143. Andoh M, Andoh R, Teramoto K, Komiya T, Kaneshima T, Takano A, et al. Survey of *Coxiella burnetii* in ticks collected from dogs in Japan. *J Vet Med Sci.* (2013) 75:1115–7. doi: 10.1292/jvms.12-0570
  144. Cardinale E, Esnault O, Beral M, Naze F, Michault A. Emergence of *Coxiella burnetii* in ruminants on Reunion Island? Prevalence and risk factors. *PLoS Negl Trop Dis.* (2014) 8:e3055. doi: 10.1371/journal.pntd.0003055
  145. Nelder MP, Reeves WK, Adler PH, Wozniak A, Wills W. Ectoparasites and associated pathogens of free-roaming and captive animals in zoos of South Carolina. *Vector Borne Zoon Dis.* (2009) 9:469–77. doi: 10.1089/vbz.2008.0008
  146. Sanders DM, Parker JE, Walker WW, Buchholz MW, Blount K, Kiel JL. Field collection and genetic classification of tick-borne *Rickettsiae* and *Rickettsiae*-like pathogens from South Texas: *Coxiella burnetii* isolated from field-collected *Amblyomma cajennense*. *Ann N Y Acad Sci.* (2008) 1149:208–11. doi: 10.1196/annals.1428.022
  147. Estrada-Pena A, Gray JS, Kahl O, Lane RS, Nijhof AM. Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens-methodological principles and caveats. *Front Cell Infect Microbiol.* (2013) 3:29. doi: 10.3389/fcimb.2013.00029
  148. Bolanos-Rivero M, Carranza-Rodriguez C, Rodriguez NF, Gutierrez C, Perez-Arellano JL. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in peridomestic and wild animals and ticks in an endemic region (Canary Islands, Spain). *Vector Borne Zoon Dis.* (2017) 17:630–4. doi: 10.1089/vbz.2017.2120
  149. González-Barrio D, Jado I, Fernández-de-Mera IG, Del Rocio Fernández-Santos M, Rodríguez-Vargas M, García-Amil C, et al. Genotypes of *Coxiella burnetii* in wildlife: disentangling the molecular epidemiology of a multi-host pathogen. *Environ Microbiol Rep.* (2016) 8:708–14. doi: 10.1111/1758-2229.12431
  150. Michelet L, Joncour G, Devillers E, Torina A, Vayssier-Taussat M, Bonnet SI, et al. Tick species, tick-borne pathogens and symbionts in an insular environment off the coast of Western France. *Ticks Tick Borne Dis.* (2016) 7:1109–15. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.08.014
  151. Dubourg G, Socolovschi C, Del Giudice P, Fournier PE, Raoult D. Scalp eschar and neck lymphadenopathy after tick bite: an emerging syndrome with multiple causes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* (2014) 33:1449–56. doi: 10.1007/s10096-014-2090-2
  152. Ciliberti A, Gavier-Widén D, Yon L, Hutchings MR, Artois M. Prioritisation of wildlife pathogens to be targeted in European surveillance programmes: expert-based risk analysis focus on ruminants. *Prev Vet Med.* (2015) 118:271–84. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.11.021
  153. Mori M, Mertens K, Cutler SJ, Santos AS. Critical aspects for detection of *Coxiella burnetii*. *Vector Borne Zoon Dis.* (2017) 17:33–41. doi: 10.1089/vbz.2016.1958
  154. Dupraz M, Toty C, Devillers E, Blanchon T, Elguero E, Vittecoq M, et al. Population structure of the soft tick *Ornithodoros maritimus* and its associated infectious agents within a colony of its seabird host *Larus michahellis*. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* (2017) 6:122–30. doi: 10.1016/j.ijppaw.2017.05.001
  155. Binetruy F, Buysse M, Lejarre Q, Barosi R, Villa M, Rahola N, et al. Microbial community structure reveals instability of nutritional symbiosis during the evolutionary radiation of *Amblyomma* ticks. *Mol Ecol.* (2020) 29:1016–29. doi: 10.1111/mec.15373
  156. Coimbra-Dores MJ, Jaarsma RI, Carmo AO, Maia-Silva M, Fonville M, da Costa DFE, et al. Mitochondrial sequences of *Rhipicephalus* and *Coxiella* endosymbiont reveal evidence of lineages co-cladogenesis. *FEMS Microbiol Ecol.* (2020) 96(6). doi: 10.1093/femsec/fiaa072
  157. Klyachko O, Stein BD, Grindle N, Clay K, Fuqua C. Localization and visualization of a *Coxiella*-type symbiont within the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Appl Environ Microbiol.* (2007) 73:6584–94. doi: 10.1128/aem.00537-07
  158. Brenner AE, Muñoz-Leal S, Sachan M, Labruna MB, Raghavan R. Ticks convert pathogenic *Coxiella* into endosymbionts. *bioRxiv.* (2020). doi: 10.1101/2020.12.29.424491
  159. Li L-H, Zhang Y, Zhu D, Zhou X-N. Endosymbionts alter larva-to-nymph transstadial transmission of *Babesia microti* in *Rhipicephalus haemaphysaloides* ticks. (2018) 9:1415. doi: 10.3389/fmicb.2018.01415
  160. Gofton AW, Oskam CL, Lo N, Beninati T, Wei H, McCarl V, et al. Inhibition of the endosymbiont "*Candidatus Midichloria mitochondrii*" during 16S rRNA gene profiling reveals potential pathogens in *Ixodes* ticks from Australia. *Parasit Vectors.* (2015) 8:345. doi: 10.1186/s13071-015-0958-3
  161. González J, González MG, Valcárcel F, Sánchez M, Martín-Hernández R, Tercero JM, et al. Transstadial transmission from nymph to adult of *Coxiella*

- burnetii* by naturally infected *Hyalomma lusitanicum*. *Pathogens*. (2020) 9:884. doi: 10.3390/pathogens9110884
162. Eisen L. Vector competence studies with hard ticks and *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes: a review. *Ticks Tick Borne Dis.* (2020) 11:101359. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.101359
163. Salazar R, Castillo-Neyra R, Tustin AW, Borrini-Mayori K, Nájaira C, Levy MZ. Bed bugs (*Cimex lectularius*) as vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg.* (2015) 92:331–5. doi: 10.4269/ajtmh.14-0483
164. Houhamdi L, Fournier P-E, Fang R, Lepidi H, Raoult D. An experimental model of human body louse infection with *Rickettsia prowazekii*. *J Infect Dis.* (2002) 186:1639–46. doi: 10.1086/345373
165. Selmi R, Mamlouk A, Ben Yahia H, Abdelaali H, Ben Said M, Sellami K, et al. *Coxiella burnetii* in Tunisian dromedary camels (*Camelus dromedarius*): Seroprevalence, associated risk factors and seasonal dynamics. *Acta Trop.* (2018) 188:234–9. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.09.008
166. Cikman A, Aydin M, Gulhan B, Karakecili F, Ozcicek A, Kesik O, et al. The seroprevalence of *Coxiella burnetii* in Erzincan, Turkey: identification of the risk factors and their relationship with geographical features. (2017) 54:157–63. Available online at: <https://www.jvbd.org/downloadpdf.asp?>
167. Menadi SE, Mura A, Santucci C, Ghalmi F, Hafsi F, Masala G. Seroprevalence and risk factors of *Coxiella burnetii* infection in cattle in northeast Algeria. *Trop Anim Health Prod.* (2019) 52:935–42. doi: 10.1007/s11250-019-02083-x
168. van Engelen E, Schotten N, Schimmer B, Hautvast JL, van Schaik G, van Duijnhoven YT. Prevalence and risk factors for *Coxiella burnetii* (Q fever) in Dutch dairy cattle herds based on bulk tank milk testing. *Prev Vet Med.* (2014) 117:103–9. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.08.016
169. Cantas H, Muwonge A, Sareyyupoglu B, Yardimci H, Skjerve E. Q fever abortions in ruminants and associated on-farm risk factors in northern Cyprus. *BMC Vet Res.* (2011) 7:13. doi: 10.1186/1746-6148-7-13
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2021 Körner, Makert, Ulbert, Pfeffer and Mertens-Scholz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**Table S1.** Included studies on prevalence of *C. burnetii* in ticks in Europe

	Reference	Country	Tick species	N	n	Proportion (CI)	Method/Target gene	origin	Sequenced	CLE
(1)	Andersson et al. 2018	Romania	D.m. (0/92), D.r. (0/119), H.c. (0/3), H.p. (0/38), Hy.m. (0/26), Hy.s. (0/1) I.c. (0/7), I.r. (0/209), R.b. (0/15), R.r. (0/1), R.s. (0/314)	825 <sup>2</sup>	0	0.00 <sup>1</sup>	qPCR ( <i>com1</i> , <i>icd</i> , IS1111)	mixed		
(2)	Astobiza et al. 2011	Spain	D.m., D.r., H.p., I.h., I.r.	340	0	0.00	qPCR (IS1111)	animals		
(3)	Barandika et al. 2008	Spain	D.r. (0/97), H.c. (0/52), H.i. (0/95), H.p. (1/109), I.r. (0/288), R.b. (0/50)	691	1	0.00	PCR, Hybridization ( <i>htpAB</i> )	vegetation	no	
(4)	Beltrame et al. 2018	Italy	I.r. (0/43), R.s. (0/2)	45	0	0.00	qPCR (IS30a)	humans		
(5)	Bernasconi et al. 2002	Switzerland	D.m. (0/1), H.spp. (0/1), R.s. (0/24), R.t. (0/22)	48	0	0.00	PCR (16S rDNA)	animals		R.s., R.t.
(6)	Berthova et al. 2016	Slovakia	I.r. (16/594)	594	16	0.03 (0.01-0.04)	PCR ( <i>com1</i> )	animals	no	
(7)	Bielawska-Drózd et al. 2018	Poland	I.r. (17/1551)	1551	17	0.01 (0.01-0.02) <sup>1</sup>	qPCR (IS1111)	vegetation	no	
(8)	Bogunovic et al. 2018	Serbia	D.r. (0/1), I.r. (0/87), R.s. (24/228)	316	24	0.08 (0.05-0.11)	PCR (IS1111)	animals	yes	

Veröffentlichungen

(9)	Bonnet et al. 2013	France	D.m. (44/377), D.r. (12/74), I.r. (8/44)	495	64	0.13 (0.10-0.16)	qPCR (IS1111)	vegetation	no
(10)	Cerutti et al. 2018	Italy	I.r., Hy.spp., Hy.d./m., Hy.l., A.spp., I.ar.	114	0	0.00	qPCR (IS1111)	animals	
(11)	Chaligiannis et al. 2018	Greece	D.m. (pos), H.pa. (pos), H.p., H.s. (pos), I.g. (pos), R.b., R.s. (pos)	179	32	0.18 (0.12-0.23)	qPCR (IS1111)	animals	yes (7 samples)
(12)	Chisu et al. 2018	Italy	D.m. (0/272), H.p. (0/71), H.s. (0/30), Hy.l. (0/73), Hy.m. (2/45), I.fe. (0/6), R.a. (2/11), R.b. (3/400), R.s. (14/710)	1618	21	0.01 (0.01-0.02)	PCR ( <i>sodB</i> )	mixed	yes
(13)	Chisu et al. 2020a	Italy	D.m. (1/15), H.p. (0/5), H.s. (0/9), Hy.l. (0/1), Hy.m. (1/8), I.spp. (0/1), I.fe. (0/1), R.spp. (0/7), R.b. (5/34), R.s. (22/149)	230	29	0.13 (0.08-0.17)	PCR ( <i>sodB</i> )	animals	yes
(14)	Chisu et al 2020b	Italy	I.r. (0/37)	37	0	0.00	PCR ( <i>sodB</i> )	animals	
(15)	Chitimia-Dobler et al. 2019	Germany	Hy.m. (0/10), Hy.r. (0/8)	18	0	0.00	qPCR (IS1111)	mixed	
(16)	Desjardins et al. 2018	France	D.spp. (2/5), H.spp. (5/21),	454	163	0.36 (0.31-0.40)	qPCR (IS1111)	animals	no

Veröffentlichungen

			Hy.spp. (16/45), R.spp. (140/383)							
(17)	Duh et al. 2006	Slovakia	D.r. (0/100)	100	0	0.00	PCR(IS1111)	vegetation		
(18)	Ebani et al. 2015	Italy	D.m. (0/72), H.p. (0/30), I.r. (0/330)	432	0	0.00 <sup>1</sup>	PCR (IS1111)	animals		
(19)	González et al. 2020	Spain	Hy.l. (128/236)	236	128	0.54 (0.48-0.61)	qPCR (IS1111)	animals	no	
(20)	Grech-Angelini et al. 2019	France	D.m. (0/156), H.p. (0/74), H.s. (0/2), Hy.m. (0/362), Hy.s. (0/135), I.r. (0/115), R.a. (0/11), R.b. (0/508), R.s. (0/150)	1513	0	0.00	qPCR ( <i>icd</i> , IS1111)	animals		
(21)	Gyuranecz et al. 2012	Hungary	D.spp. (0/4), D.m. (0/369), D.r. (0/361), H.c. (0/735), H.i. (0/315), H.p. (0/22), I.ac. (0/374), I.r. (0/3222)	5402	0	0.00	qPCR (IS1111)	mixed		
(22)	Hartelt et al. 2008	Germany	D. spp. (0/862)	862	0	0.00	nested PCR (IS1111)	vegetation		
(23)	Henning et al. 2006	Germany	I.spp. (0/52)	52	0	0.00	PCR ( <i>com1</i> , <i>mucZ</i> )	animals		
(24)	Hildebrandt et al. 2011	Germany	I.r. (19/1000)	1000	19	0.02 (0.01-0.03)	qPCR (IS1111, <i>icd</i> )	vegetation	no	
(25)	Hornók et al. 2013	Hungary	H.c. (0/1), Hy.m. (0/3), I.r. (0/104)	108	0	0.00	qPCR (IS1111)	animals		

Veröffentlichungen

(26)	Kalmár et al. 2020	Romania	I.r. (0/522)	522	0	0.00	qPCR (IS1111)	humans	
(27)	Kazimirová et al. 2018	Slovakia	H.c. (0/33), I.r. (6/641)	674	6	0.01 (0.00-0.02) <sup>1</sup>	PCR ( <i>comI</i> )	animals	no
(28)	Knap et al. 2019	Slovenia	D.r. (0/10), H.p. (1/65), I.r. (6/626)	701	17	0.02 (0.01-0.04)	qPCR (IS1111)	mixed	no
(29)	Mancini et al. 2014	Italy	D.m. (1/7), H.p. (1/4), I.r. (3/33), R.t. (23/85)	129	28	0.22 (0.15-0.29)	qPCR ( <i>icd</i> )	vegetation	no
(30)	Mancini et al. 2019	Italy	Hy.m. (4/12), R.a. (70/215), R.b. (9/28)	255	83	0.33 (0.27-0.38)	qPCR ( <i>icd</i> ; IS1111)	vegetation	no
(31)	Michelet et al. 2014	France	I.r. (0/2350)	2350	0	0.00	qPCR ( <i>icd</i> ; IS1111)	vegetation	
		Denmark	I.r. (0/2350)	2350	0	0.00	qPCR ( <i>icd</i> ; IS1111)	vegetation	
		The Netherlands	I.r. (0/2350)	2350	0	0.00	qPCR ( <i>icd</i> ; IS1111)	vegetation	
(32)	Michelet et al. 2016	France	D.m. (0/67), D.r. (0/29), H.p. (0/532)	628	0	0.00	qPCR ( <i>icd</i> )	vegetation	
(33)	Millán et al. 2016	Spain	I. spp. (0/43), R.s. (0/266)	309	0	0.00	qPCR (16S rRNA)	animals	
(34)	Minichová et al. 2017	Slovakia	D.m. (0/182), H.c. (0/166), H.c. (0/5), I.r. (0/3983)	4336	0	0.00	qPCR ( <i>comI</i> )	mixed	
(35)	Pajoro et al. 2018	Italy	I.r. (0/251)	251	0	0.00	PCR (IS1111)	animals	
(36)	Papa et al. 2017	Greece	D.m. (0/11), H.pa. (0/2), I.r. (0/10), R.spp.	64	0	0.00 <sup>1</sup>	PCR (16S rRNA)	animals	D.m., I.r., H.pa.,



Veröffentlichungen

			I.r. (1/37), I.v. (9/92), R.p. (0/22), R.s. (2/54)							
(48)	Santos-Silva et al. 2017	Portugal	D.m. (1/13), Hy.l. (31/175), I.r. (1/4), R.b. (0/7), R.p. (1/21), R.s. (0/11)	231	34	0.14 (0.10-0.19)	qPCR (IS1111)	mixed	no	
(49)	Satta et al. 2011	Italy	D.m. (0/15), H.s. (1/25), Hy.m. (0/15), R.b. (0/90), R.p. (0/5), R.s. (5/1045), R.t. (1/290)	1485	7	0.00 (0.00-0.01) <sup>1</sup>	PCR ( <i>sodB</i> )	animals	no	
(50)	Schabereiter-Gurtner et al. 2003	Austria	I.r. (0/22)	22	0	0.00 <sup>1</sup>	PCR (16S rRNA)	vegetation		I.r.
(51)	Schötta et al. 2017	Austria	I. r. (0/554)	554	0	0.00	PCR-RLB ( <i>htpAB</i> )	vegetation		
(52)	Smetanova et al. 2006	Slovakia	D.m. (0/16), D.r. (0/9), I.r. (2/327)	352	2	0.01 (0.00-0.01)	PCR ( <i>comI</i> )	mixed	no	
(53)	Socolovschi et al. 2012	France	D.m. (0/2), H.spp. (0/1), H.p. (0/1), Hy.spp. (0/1), Hy.r. (0/1), I.spp. (0/12), R.s. (1/96), R.t. (0/4)	118	1	0.01 (0.00-0.03)	qPCR (IS30A, IS1111)	animals	no	
(54)	Spitalska et al. 2002	Slovakia	D.r. (0/1), H.c. (1/26), I.r. (1/106)	133	2	0.02 (0.00-0.04)	PCR ( <i>comI</i> ), hemocyte test	vegetation	no	

Veröffentlichungen

(55)	Spitalska and Kocianova 2003a	Slovakia/ Hungary	D.m. (3/43), D.r. (0/1), H.c. (1/26), H.i. (0/7), I.r. (2/158)	263 <sup>2</sup>	6	0.03 (0.01-0.05)	PCR ( <i>com1</i> ), RFLP, hemocyte test	vegetation	no	
(56)	Spitalska and Kocianova 2003b	Slovakia	D.r. (0/5), H.c. (1/32), I.r. (1/141)	178 <sup>2</sup>	2	0.01 (0.00-0.03)	PCR ( <i>com1</i> ), hemocyte test	vegetation	no	
(57)	Spitalska et al. 2006	Slovakia	I.r. (0/92)	92	0	0.00	PCR ( <i>com1</i> )	animals		
(58)	Spitalska et al. 2018	Slovakia	D.r. (7/334), H.i. (0/108), I.r. (8/163)	605	15	0.02 (0.01-0.04)	qPCR (16S rRNA/ <i>groEL</i> )	vegetation	yes (33 samples)	D.r., H.i., I.r.
(59)	Sprong et al. 2012	The Netherlands	D.r. (0/1), I.r. (6/2976)	2977	5 <sup>3</sup>	0.00	qPCR (IS1111, <i>icd</i> , <i>com1</i> )	mixed		
(60)	Sprong et al. 2019	Great Britain	D.r. (0/113)	113	0	0.00	qPCR ( <i>icd</i> /IS1111)	vegetation	no	
		Belgium	D.r. (1/513) <sup>3</sup>	513	0 <sup>4</sup>	0.00 (0.00-0.01)	qPCR ( <i>icd</i> /IS1111)	vegetation		
		Germany	D.r. (0/255)	255	0	0.00	qPCR ( <i>icd</i> /IS1111)	vegetation		
		The Netherlands	D.r. (0/860)	860	0	0.00	qPCR ( <i>icd</i> /IS1111)	vegetation		
(61)	Subramanian et al. 2012	Slovakia	I.r. (0/80)	80	0	0.00	qPCR (IS1111)	vegetation	no	
(62)	Sukara et al. 2018	Serbia	D.r. (0/47), H.c. (0/7), I.r. (0/64)	118	0	0.00	qPCR ( <i>com1</i> )	animals		
(63)	Szymanska-Czerwinska et al. 2013	Poland	I.r. (191/1200)	1200	191	0.16 (0.14-0.18)	qPCR (IS1111)	vegetation	no	
(64)	Tijssse-Klasen et al. 2015	Great Britain	D.r. (0/61), H.p. (0/99)	160	0	0.00	qPCR	vegetation		

Veröffentlichungen

(65)	Tokarevich et al. 2019	Bulgaria <sup>5</sup>	D.spp. (0/7), D.r. (1/54), H.spp. (0/1), Hy.spp. (0/3), I.r. (0/10), R.spp. (0/10), R.b. (0/2), R.s. (0/12)	99	1	0.01 (0-0.03)	PCR ( <i>com1</i> , 16SrRNA)	vegetation	yes	
(66)	Toledo et al. 2009	Spain	A.l. (0/1), D.m. (25/348), H.h. (0/6), H.p. (0/1), Hy.l. (67/795), Hy.m. (0/13), I.r. (0/8), R.b. (0/56), R.p. (1/108), R.s. (2/146)	1482	95	0.06 (0.05-0.08)	PCR, RLB (IS1111)	mixed	no	
(67)	Toma et al. 2014	Italy	A.spp. (0/5), Hy.spp. (2/8), Hy.m. (10/37), Hy.r. (29/71), I.spp. (1/6)	127	42	0.33 (0.25-0.41)	qPCR ( <i>icd</i> )	animals	no	
(68)	Tomanovic et al. 2013	Serbia	D.m. (0/15), D.r. (2/53), H.c. (10/35), H.p. (0/2), I.r. (17/27)	132	29	0.22 (0.15-0.29)	PCR ( <i>sodB</i> )	vegetation	yes	
(69)	Varela-Castro et al. 2018	Spain	D.m. (1/11), H.p. (5/23), H.s. (6/28), Hy.m. (0/1), R.b. (52/601), R.s. (3/5)	669	67	0.10 (0.08-0.12) <sup>1</sup>	PCR (IS1111)	animals	yes (5 samples)	
(70)	Vila et al. 2019	Spain	D.r., Hy.m., I.r., I.h., R.s.	1600	0	0.00 <sup>1</sup>	PCR (16srRNA)	animals		I.h., I.r., R.s.

Veröffentlichungen

(71)	Wallménius et al. 2012	Sweden	I.r. (0/786)	786	0	0.00	qPCR ( <i>icd</i> )	mixed	
(72)	Zhang et al. 2019	Slovakia	D.m. (0/24), D.r. (0/24)	48	0	0.00	PCR (16srRNA)	vegetation	D.m., D.r. ( <i>C.</i> <i>spp.</i> )

A.l. *Amblyomma latum*; A.v. *Amblyomma variegatum*; D.m. *Dermacentor marginatus*; D.r. *Dermacentor reticulatus*; H.c. *Haemaphysalis concinna*; H.h. *Haemaphysalis hispanica*; H.i. *Haemaphysalis inermis*; H.p. *Haemaphysalis punctata*; H.pa. *Haemaphysalis parva*; H.s. *Haemaphysalis sulcata*; Hy ae. *Hyalomma aegyptium*; Hy.d. *Hyalomma dromedarii*; Hy.l. *Hyalomma lusitanicum*; Hy.m. *Hyalomma marginatum*; Hy.r. *Hyalomma rufipes*; Hy.s. *Hyalomma scupense*; Hy.t. *Hyalomma truncatum*; I.ar. *Ixodes arbuticola*; I.c. *Ixodes crenulatus*; I.fe. *Ixodes festai*; I.fr. *Ixodes frontalis*; I.g. *Ixodes gibbosus*; I.h. *Ixodes hexagonus*; I.r. *Ixodes ricinus*; I.v. *Ixodes ventralloi*; R.a. *Rhipicephalus annulatus*; R.b. *Rhipicephalus bursa*; R.p. *Rhipicephalus pusillus*; R.r. *Rhipicephalus rossicus*; R.s. *Rhipicephalus sanguineus* s.l.; R.t. *Rhipicephalus turanicus*

N amount of ticks tested for *Coxiella*-DNA; n *Coxiella*-positive ticks

<sup>1</sup>Ticks tested in pools, MIR <sup>2</sup>Different total amount given in the Text <sup>3</sup> sampled from vaccinated herd, 5 further ticks only IS1111 positive <sup>4</sup>1 tick *icd* positive but IS1111 negative <sup>5</sup>Further ticks were collected in Russia

1. 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
2. Astobiza I, Barral M, Ruiz-Fons F, Barandika JF, Gerrikagoitia X, Hurtado A, et al. Molecular investigation of the occurrence of *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. *Vet Microbiol* (2011) 147(1-2):190-4. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.05.046
3. Barandika JF, Hurtado A, Garcia-Sanmartin J, Juste RA, Anda P, Garcia-Perez AL. Prevalence of tick-borne zoonotic bacteria in questing adult ticks from northern Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* (2008) 8(6):829-35. doi: 10.1089/vbz.2008.0023
4. Beltrame A, Laroche M, Degani M, Perandin F, Bisoffi Z, Raoult D, et al. Tick-borne pathogens in removed ticks Veneto, northeastern Italy: A cross-sectional investigation. *Travel Medicine and Infectious Disease* (2018) 26. doi: 10.1016/j.tmaid.2018.08.008
5. Bernasconi MV, Casati S, Peter O, Piffaretti JC. *Rhipicephalus* ticks infected with *Rickettsia* and *Coxiella* in Southern Switzerland (Canton Ticino). *Infect Genet Evol* (2002) 2(2):111-20. doi: 10.1016/s1567-1348(02)00092-8
6. Berthová L, Slobodník V, Slobodník R, Olekšák M, Sekeyová Z, Svitáľková Z, et al. The natural infection of birds and ticks feeding on birds with *Rickettsia* spp. and *Coxiella burnetii* in Slovakia. *Exp Appl Acarol* (2016) 68(3):299-314. doi: 10.1007/s10493-015-9975-3

7. Bielawska-Drózd A, Cieślik P, Żakowska D, Głowacka P, Wlizło-Skowronek B, Zięba P, et al. Detection of *Coxiella burnetii* and *Francisella tularensis* in Tissues of Wild-living Animals and in Ticks of North-west Poland. *Pol J Microbiol* (2018) 67(4):529-34. doi: 10.21307/pjm-2018-059
8. Bogunovic D, Stević N, Sidi-Boumedine K, Misic D, Tomanović S, Kulišić Z, et al. Molecular evidence of Q Fever agent *Coxiella burnetii* in ixodid ticks collected from stray dogs in Belgrade (Serbia). *Acta Veterinaria* (2018) 68:257-68. doi: 10.2478/acve-2018-0023
9. Bonnet S, de la Fuente J, Nicollet P, Liu X, Madani N, Blanchard B, et al. Prevalence of tick-borne pathogens in adult *Dermacentor* spp. ticks from nine collection sites in France. *Vector Borne Zoonotic Dis* (2013) 13(4):226-36. doi: 10.1089/vbz.2011.0933
10. Cerutti F, Modesto P, Rizzo F, Cravero A, Jurman I, Costa S, et al. The microbiota of hematophagous ectoparasites collected from migratory birds. *PLoS One* (2018) 13(8):e0202270. doi: 10.1371/journal.pone.0202270
11. Chaligiannis I, Fernandez de Mera IG, Papa A, Sotiraki S, de la Fuente J. Molecular identification of tick-borne pathogens in ticks collected from dogs and small ruminants from Greece. *Exp Appl Acarol* (2018) 74(4):443-53. doi: 10.1007/s10493-018-0237-z
12. Chisu V, Foxi C, Mannu R, Satta G, Masala G. A five-year survey of tick species and identification of tick-borne bacteria in Sardinia, Italy. *Ticks Tick Borne Dis* (2018) 9(3):678-81. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.02.008
13. Chisu V, Loi F, Foxi C, Chessa G, Masu G, Rolesu S, et al. Coexistence of tick-borne pathogens in ticks collected from their hosts in Sardinia: an update. *Acta Parasitol* (2020). doi: 10.1007/s11686-020-00240-z
14. Chisu V, Foxi C, Masu G, B DA, Masala G. Detection of potentially pathogenic bacteria from *Ixodes ricinus* carried by pets in Tuscany, Italy. *Vet Rec Open* (2020) 7(1):e000395. doi: 10.1136/vetreco-2020-000395
15. Chitimia-Dobler L, Schaper S, Rieß R, Bitterwolf K, Frangoulidis D, Bestehorn M, et al. Imported *Hyalomma* ticks in Germany in 2018. *Parasites & vectors* (2019) 12(1):134. doi: 10.1186/s13071-019-3380-4
16. Desjardins I, Joulié A, Pradier S, Lecollinet S, Beck C, Vial L, et al. Seroprevalence of horses to *Coxiella burnetii* in an Q fever endemic area. *Vet Microbiol* (2018) 215:49-56. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.11.012
17. Duh D, Slovák M, Saksida A, Strašek K, Petrovec M, Avšič-Županc T. Molecular detection of *Babesia canis* in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in Slovakia. *Biologia* (2006) 61(2):231-3. doi: 10.2478/s11756-006-0035-7
18. Ebani VV, Bertelloni F, Turchi B, Filogari D, Cerri D. Molecular survey of tick-borne pathogens in Ixodid ticks collected from hunted wild animals in Tuscany, Italy. *Asian Pac J Trop Med* (2015) 8(9):714-7. doi: 10.1016/j.apjtm.2015.07.033
19. González J, González MG, Valcárcel F, Sánchez M, Martín-Hernández R, Tercero JM, et al. Prevalence of *Coxiella burnetii* (Legionellales: Coxiellaceae) infection among wildlife species and the tick *Hyalomma lusitanicum* (Acari: Ixodidae) in a meso-Mediterranean ecosystem. *J Med Entomol* (2020) 57(2):551-6. doi: 10.1093/jme/tjz169
20. Grech-Angelini S, Stachurski F, Vayssier-Taussat M, Devillers E, Casabianca F, Lancelot R, et al. Tick-borne pathogens in ticks (Acari: Ixodidae) collected from various domestic and wild hosts in Corsica (France), a Mediterranean island environment. *Transbound Emerg Dis* (2020) 67(2):745-57. doi: 10.1111/tbed.13393

21. Gyuranecz M, Dénes B, Hornok S, Kovács P, Horváth G, Jurkovich V, et al. Prevalence of *Coxiella burnetii* in Hungary: screening of dairy cows, sheep, commercial milk samples, and ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* (2012) 12(8):650-3. doi: 10.1089/vbz.2011.0953
22. Hartelt K, Pluta S, Oehme R, Kimmig P. Spread of ticks and tick-borne diseases in Germany due to global warming. *Parasitol Res* (2008) 103 Suppl 1:S109-16. doi: 10.1007/s00436-008-1059-4
23. Henning K, Greiner-Fischer S, Hotzel H, Ebsen M, Theegarten D. Isolation of *Spiroplasma* sp. from an *Ixodes* tick. *Int J Med Microbiol* (2006) 296 Suppl 40:157-61. doi: 10.1016/j.ijmm.2006.01.012
24. Hildebrandt A, Straube E, Neubauer H, Schmoock G. *Coxiella burnetii* and coinfections in *Ixodes ricinus* ticks in Central Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis* (2011) 11(8):1205-7. doi: 10.1089/vbz.2010.0180
25. Hornok S, Csörgő T, de la Fuente J, Gyuranecz M, Privigyei C, Meli M, et al. Synanthropic Birds Associated with High Prevalence of Tick-Borne *Rickettsiae* and with the First Detection of *Rickettsia aeschlimannii* in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis* (2013) 13. doi: 10.1089/vbz.2012.1032
26. Kalmár Z, Dumitrache M, d'amico G, Matei I, Ionică A, Gherman C, et al. Multiple tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks collected from humans in Romania. *Pathogens* (2020) 9:390. doi: 10.3390/pathogens9050390
27. Kazimírová M, Hamšíková Z, Špitalská E, Minichová L, Mahríková L, Caban R, et al. Diverse tick-borne microorganisms identified in free-living ungulates in Slovakia. *Parasites & vectors* (2018) 11(1):495. doi: 10.1186/s13071-018-3068-1
28. Knap N, Zele D, Glinsek Biskup U, Avsic-Zupanc T, Vengust G. The prevalence of *Coxiella burnetii* in ticks and animals in Slovenia. *BMC Vet Res* (2019) 15(1):368. doi: 10.1186/s12917-019-2130-3
29. Mancini F, Di Luca M, Toma L, Vescio F, Bianchi R, Khoury C, et al. Prevalence of tick-borne pathogens in an urban park in Rome, Italy. *Ann Agric Environ Med* (2014) 21(4):723-7. doi: 10.5604/12321966.1129922
30. Mancini F, Vescio MF, Toma L, Di Luca M, Severini F, Caccio SM, et al. Detection of tick-borne pathogens in ticks collected in the suburban area of Monte Romano, Lazio Region, Central Italy. *Ann Ist Super Sanita* (2019) 55(2):143-50. doi: 10.4415/ann\_19\_02\_06
31. Michelet L, Delannoy S, Devillers E, Umhang G, Aspan A, Juremalm M, et al. High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Front Cell Infect Microbiol* (2014) 4:103. doi: 10.3389/fcimb.2014.00103
32. Michelet L, Joncour G, Devillers E, Torina A, Vayssier-Taussat M, Bonnet SI, et al. Tick species, tick-borne pathogens and symbionts in an insular environment off the coast of Western France. *Ticks Tick Borne Dis* (2016) 7(6):1109-15. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.08.014
33. Millán J, Proboste T, Fernández de Mera IG, Chirife AD, de la Fuente J, Altet L. Molecular detection of vector-borne pathogens in wild and domestic carnivores and their ticks at the human-wildlife interface. *Ticks Tick Borne Dis* (2016) 7(2):284-90. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.11.003
34. Minichová L, Hamšíková Z, Mahríková L, Slovák M, Kocianová E, Kazimírová M, et al. Molecular evidence of *Rickettsia* spp. in ixodid ticks and rodents in suburban, natural and rural habitats in Slovakia. *Parasites & vectors* (2017) 10(1):158. doi: 10.1186/s13071-017-2094-8
35. Pajoro M, Pistone D, Varotto Boccazzi I, Mereghetti V, Bandi C, Fabbi M, et al. Molecular screening for bacterial pathogens in ticks (*Ixodes ricinus*) collected on migratory birds captured in northern Italy. *Folia Parasitol (Praha)* (2018) 65. doi: 10.14411/fp.2018.008

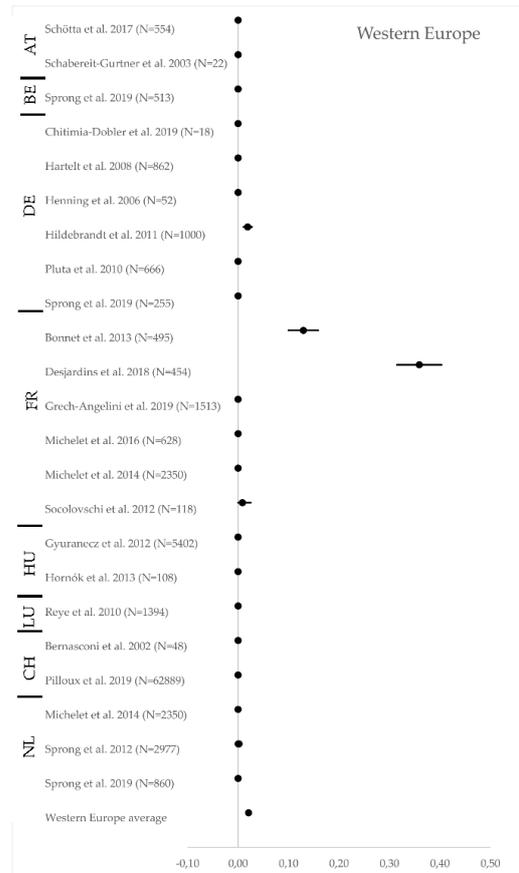
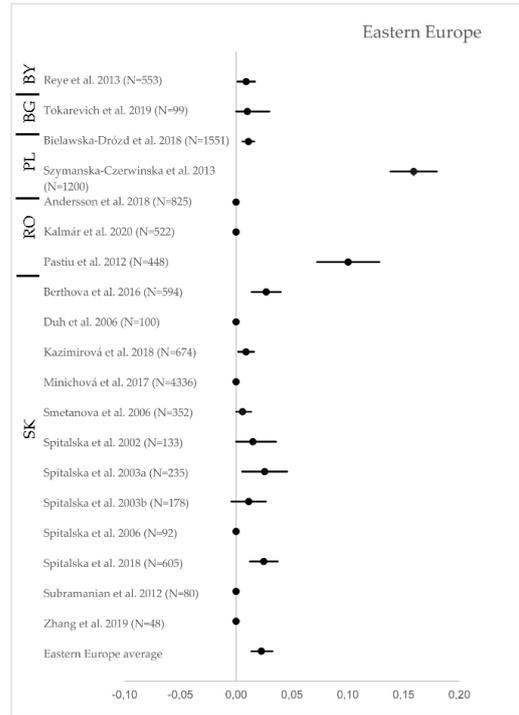
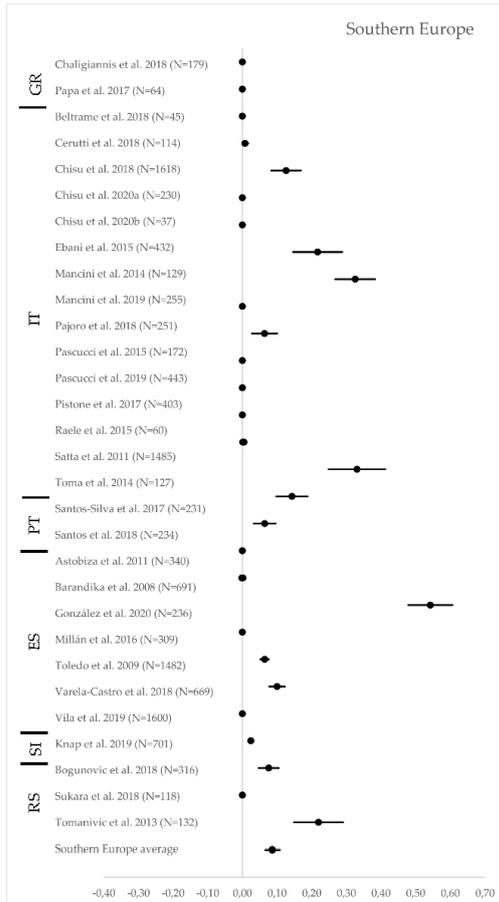
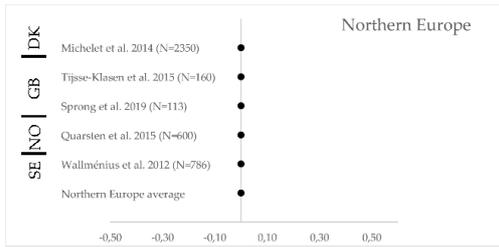
36. Papa A, Tsioka K, Kontana A, Papadopoulos C, Giadinis N. Bacterial pathogens and endosymbionts in ticks. *Ticks Tick Borne Dis* (2017) 8(1):31-5. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.09.011
37. Pascucci I, Di Domenico M, Dall'Acqua F, Sozio G, Cammà C. Detection of Lyme disease and Q Fever agents in wild rodents in Central Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* (2015) 15(7):404-11. doi: 10.1089/vbz.2015.1807
38. Pascucci I, Di Domenico M, Capobianco Dondona G, Di Gennaro A, Polci A, Capobianco Dondona A, et al. Assessing the role of migratory birds in the introduction of ticks and tick-borne pathogens from African countries: An Italian experience. *Ticks Tick Borne Dis* (2019) 10(6):101272. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.101272
39. Paștiu AI, Matei IA, Mihalca AD, D'Amico G, Dumitrache MO, Kalmár Z, et al. Zoonotic pathogens associated with *Hyalomma aegyptium* in endangered tortoises: evidence for host-switching behaviour in ticks? *Parasites & vectors* (2012) 5(1):301. doi: 10.1186/1756-3305-5-301
40. Pilloux L, Baumgartner A, Jatou K, Lienhard R, Ackermann-Gaumann R, Beuret C, et al. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Coxiella burnetii* in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland: an underestimated epidemiologic risk. *New Microbes New Infect* (2019) 27:22-6. doi: 10.1016/j.nmni.2018.08.017
41. Pistone D, Pajoro M, Novakova E, Vicari N, Gaiardelli C, Viganò R, et al. Ticks and bacterial tick-borne pathogens in Piemonte region, Northwest Italy. *Exp Appl Acarol* (2017) 73(3-4):477-91. doi: 10.1007/s10493-017-0202-2
42. Pluta S, Hartelt K, Oehme R, Mackenstedt U, Kimmig P. Prevalence of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. in ticks and rodents in southern Germany. *Ticks Tick Borne Dis* (2010) 1(3):145-7. doi: 10.1016/j.ttbdis.2010.04.001
43. Quarsten H, Skarpaas T, Fajs L, Noraas S, Kjelland V. Tick-borne bacteria in *Ixodes ricinus* collected in southern Norway evaluated by a commercial kit and established real-time PCR protocols. *Ticks Tick Borne Dis* (2015) 6(4):538-44. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.04.008
44. Raele DA, Galante D, Pugliese N, De Simone E, Cafiero MA. *Coxiella*-like endosymbiont associated to the "Anatolian brown tick" *Rhipicephalus bursa* in Southern Italy. *Microbes Infect* (2015) 17(11-12):799-805. doi: 10.1016/j.micinf.2015.09.011
45. Reye AL, Hubschen JM, Sausy A, Muller CP. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Appl Environ Microbiol* (2010) 76(9):2923-31. doi: 10.1128/aem.03061-09
46. Reye AL, Stegny V, Mishayeva NP, Velhin S, Hubschen 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
47. Santos AS, de Bruin A, Veloso AR, Marques C, Pereira da Fonseca I, de Sousa R, et al. Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Candidatus Neorhlichia* sp., *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. in questing ticks from a recreational park, Portugal. *Ticks Tick Borne Dis* (2018) 9(6):1555-64. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.07.010
48. Santos-Silva MM, Melo P, Santos N, Antunes S, Duarte LR, Ferrolho J, et al. PCR screening of tick-borne agents in sensitive conservation areas, Southeast Portugal. *Mol Cell Probes* (2017) 31:42-5. doi: 10.1016/j.mcp.2016.11.005
49. Satta G, Chisu V, Cabras P, Fois F, Masala G. Pathogens and symbionts in ticks: a survey on tick species distribution and presence of tick-transmitted micro-organisms in Sardinia, Italy. *J Med Microbiol* (2011) 60(Pt 1):63-8. doi: 10.1099/jmm.0.021543-0

50. Schabereiter-Gurtner C, Lubitz W, Rölleke S. Application of broad-range 16S rRNA PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of tick-infecting bacteria. *J Microbiol Methods* (2003) 52(2):251-60. doi: 10.1016/s0167-7012(02)00186-0
51. Schötta AM, Wijnveld M, Stockinger H, Stanek G. Approaches for Reverse Line Blot-Based Detection of Microbial Pathogens in *Ixodes ricinus* Ticks Collected in Austria and Impact of the Chosen Method. *Appl Environ Microbiol* (2017) 83(13). doi: 10.1128/aem.00489-17
52. Smetanová K, Schwarzová K, Kocianová E. Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., and *Borrelia burgdorferi* s. l. in ticks, and wild-living animals in western and middle Slovakia. *Ann N Y Acad Sci* (2006) 1078:312-5. doi: 10.1196/annals.1374.058
53. Socolovschi C, Reynaud P, Kernif T, Raoult D, Parola P. Rickettsiae of spotted fever group, *Borrelia valaisiana*, and *Coxiella burnetii* in ticks on passerine birds and mammals from the Camargue in the south of France. *Ticks Tick Borne Dis* (2012) 3(5-6):355-60. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.10.019
54. Spitalská E, Kocianová E, Výrosteková V. Natural focus of *Coxiella burnetii* and *Rickettsiae* of spotted fever group in southwestern Slovakia. *Biologia* (2002) 57:585-91. doi: 10.1023/a:1023330222657
55. Spitalska E, Kocianova E. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected in Slovakia and Hungary. *Eur J Epidemiol* (2003) 18(3):263-6. doi: 10.1023/a:1023330222657
56. Spitalska E, Kocianova E. Tick-borne microorganisms in southwestern Slovakia. *Ann N Y Acad Sci* (2003) 990:196-200. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07362.x
57. Spitalska E, Literak I, Sparagano OA, Golovchenko M, Kocianova E. Ticks (Ixodidae) from passerine birds in the Carpathian region. *Wien Klin Wochenschr* (2006) 118(23-24):759-64. doi: 10.1007/s00508-006-0729-4
58. Spitalska E, Sparagano O, Stanko M, Schwarzova K, Spitalsky Z, Skultety L, et al. Diversity of *Coxiella*-like and *Francisella*-like endosymbionts, and *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii* as pathogens in the tick populations of Slovakia, Central Europe. *Ticks Tick Borne Dis* (2018) 9(5):1207-11. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.05.002
59. Sprong H, Tjisse-Klasen E, Langelaar M, De Bruin A, Fonville M, Gassner F, et al. Prevalence of *Coxiella burnetii* in ticks after a large outbreak of Q fever. *Zoonoses Public Health* (2012) 59(1):69-75. doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01421.x
60. Sprong H, Fonville M, Docters van Leeuwen A, Devillers E, Ibañez-Justicia A, Stroo A, et al. Detection of pathogens in *Dermacentor reticulatus* in northwestern Europe: evaluation of a high-throughput array. *Heliyon* (2019) 5(2):e01270. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01270
61. Subramanian G, Sekeyova Z, Raoult D, Mediannikov O. Multiple tick-associated bacteria in *Ixodes ricinus* from Slovakia. *Ticks Tick Borne Dis* (2012) 3(5-6):406-10. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.10.001
62. Sukara R, Chochlakis D, Ćirović D, Penezić A, Mihaljica D, Ćakić S, et al. Golden jackals (*Canis aureus*) as hosts for ticks and tick-borne pathogens in Serbia. *Ticks Tick Borne Dis* (2018) 9(5):1090-7. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.04.003
63. Szymanska-Czerwinska M, Galinska EM, Niemczuk K, Zasepa M. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in foresters and ticks in the south-eastern Poland and comparison of diagnostic methods. *Ann Agric Environ Med* (2013) 20(4):699-704. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.10.001

64. Tjisse-Klasen E, Hansford KM, Jahfari S, Phipps P, Sprong H, Medlock JM. Spotted fever group rickettsiae in *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis punctata* ticks in the UK. *Parasites & vectors* (2013) 6:212. doi: 10.1186/1756-3305-6-212
65. Tokarevich NK, Panferova YA, Freylikhman OA, Blinova OV, Medvedev SG, Mironov SV, et al. *Coxiella burnetii* in ticks and wild birds. *Ticks Tick Borne Dis* (2019) 10(2):377-85. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.11.020
66. Toledo A, Jado I, Olmeda AS, Casado-Nistal MA, Gil H, Escudero R, et al. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected from Central Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* (2009) 9(5):465-8. doi: 10.1089/vbz.2008.0070
67. Toma L, Mancini F, Di Luca M, Cecere JG, Bianchi R, Khoury C, et al. Detection of microbial agents in ticks collected from migratory birds in central Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* (2014) 14(3):199-205. doi: 10.1089/vbz.2013.1458
68. Tomanovic S, Chochlakis D, Radulovic Z, Milutinovic M, Cakic S, Mihaljica D, et al. Analysis of pathogen co-occurrence in host-seeking adult hard ticks from Serbia. *Exp Appl Acarol* (2013) 59(3):367-76. doi: 10.1007/s10493-012-9597-y
69. Varela-Castro L, Zuddas C, Ortega N, Serrano E, Salinas J, Castellà J, et al. On the possible role of ticks in the eco-epidemiology of *Coxiella burnetii* in a Mediterranean ecosystem. *Ticks Tick Borne Dis* (2018) 9(3):687-94. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.02.014
70. Vila A, Estrada-Peña A, Altet L, Cusco A, Dandreaano S, Francino O, et al. Endosymbionts carried by ticks feeding on dogs in Spain. *Ticks Tick Borne Dis* (2019) 10(4):848-52. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.04.003>
71. Wallmenius K, Pettersson JH, Jaenson TG, Nilsson K. Prevalence of *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Coxiella burnetii* in adult *Ixodes ricinus* ticks from 29 study areas in central and southern Sweden. *Ticks Tick Borne Dis* (2012) 3(2):100-6. doi: 10.1016/j.ttbdis.2011.11.003
72. Zhang Y-K, Yu Z-J, Wang D, Bronislava V, Branislav P, Liu J-Z. The bacterial microbiome of field-collected *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* from Slovakia. *Parasites & vectors* (2019) 12(1):325. doi: 10.1186/s13071-019-3582-9

# Veröffentlichungen

**Figure S1: Forest plot showing the prevalence or MRR and CI, sorted by the four different European regions.**



Countries are abbreviated according ISO 3166-1.  
 DK Denmark; GB Great Britain; NO Norway; SE Sweden;  
 GR Greece; IT Italy; PT Portugal; ES Spain; SI Slovenia;  
 RS Serbia; BY Belarus; BG Bulgaria; PL Poland; RO  
 Romania; SK Slovakia; AT Austria; BE Belgium; DE  
 Germany; FR France; HU Hungary; LU Luxembourg; CH  
 Switzerland; NL The Netherlands

### **3.2 Stellungnahme zum Eigenanteil an den Arbeiten zur Publikation**

Die Laborarbeiten für diese Studie wurden am Fraunhofer IZI unter der Betreuung von PD Dr. Sebastian Ulbert sowie Dr. Gustavo Rodrigues Makert dos Santos durchgeführt. An der Konzeption der Studie waren oben genannte Personen maßgeblich beteiligt.

Die beschriebenen Experimente (*in-vitro*-Fütterung der Zecken, DNA-Extraktion, quantitative PCR, Anzucht von *C. burnetii* sowie Isolation aus Zeckenmaterial in Zellkultur und axenischem Medium) sowie deren statistische Auswertung habe ich selbst durchgeführt.

Die Auswertung und Darstellung der Ergebnisse erfolgten eigenständig. Die Einleitung, der Material- und Methodenteil sowie der Ergebnisteil des Manuskripts wurden eigenständig verfasst. Die Diskussion wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. Sebastian Ulbert formuliert, die Zusammenfassung wurde durch Prof. Dr. Martin Pfeffer geschrieben.

Das Manuskript wurde für die Publikation in Zusammenarbeit mit allen Co-Autoren fertiggestellt.

## 3.2.2 Publikation 2

Körner et al. *Parasites Vectors* (2020) 13:75  
<https://doi.org/10.1186/s13071-020-3956-z>

Parasites &amp; Vectors

## RESEARCH

## Open Access



# Uptake and fecal excretion of *Coxiella burnetii* by *Ixodes ricinus* and *Dermacentor marginatus* ticks

Sophia Körner<sup>1,2</sup>, Gustavo R. Makert<sup>1</sup>, Katja Mertens-Scholz<sup>2</sup>, Klaus Henning<sup>2</sup>, Martin Pfeffer<sup>3</sup>, Alexander Starke<sup>4</sup>, Ard M. Nijhof<sup>5</sup> and Sebastian Ulbert<sup>1\*</sup>

**Abstract**

**Background:** The bacterium *Coxiella burnetii* is the etiological agent of Q fever and is mainly transmitted *via* inhalation of infectious aerosols. DNA of *C. burnetii* is frequently detected in ticks, but the role of ticks as vectors in the epidemiology of this agent is still controversial. In this study, *Ixodes ricinus* and *Dermacentor marginatus* adults as well as *I. ricinus* nymphs were fed on blood spiked with *C. burnetii* in order to study the fate of the bacterium within putative tick vectors.

**Methods:** Blood-feeding experiments were performed *in vitro* in silicone-membrane based feeding units. The uptake, fecal excretion and transstadial transmission of *C. burnetii* was examined by quantitative real-time PCR as well as cultivation of feces and crushed tick filtrates in L-929 mouse fibroblast cells and cell-free culture medium.

**Results:** Ticks successfully fed in the feeding system with engorgement rates ranging from 29% (*D. marginatus*) to 64% (*I. ricinus* adults). *Coxiella burnetii* DNA was detected in the feces of both tick species during and after feeding on blood containing 10<sup>5</sup> or 10<sup>6</sup> genomic equivalents per ml blood (GE/ml), but not when fed on blood containing only 10<sup>4</sup> GE/ml. Isolation and cultivation demonstrated the infectivity of *C. burnetii* in shed feces. In 25% of the *I. ricinus* nymphs feeding on inoculated blood, a transstadial transmission to the adult stage was detected. Females that molted from nymphs fed on inoculated blood excreted *C. burnetii* of up to 10<sup>6</sup> genomic equivalents per mg of feces.

**Conclusions:** These findings show that transstadial transmission of *C. burnetii* occurs in *I. ricinus* and confirm that *I. ricinus* is a potential vector for Q fever. Transmission from both tick species might occur by inhalation of feces containing high amounts of viable *C. burnetii* rather than *via* tick bites.

**Keywords:** *Coxiella burnetii*, Ticks, Transmission

**Background**

*Coxiella burnetii* is an obligate intracellular bacterium and distributed worldwide with the exception of New Zealand. It is known as the causal agent of Q fever and affects a wide range of hosts including humans [1, 2]. Infected ruminants, considered as the main reservoir,

show no symptoms or fertility-related complications and can shed the bacteria in large amounts during parturition or defecation [3, 4]. Human Q fever infection is often presented as an acute flu-like disease with possible complications such as pneumonia or hepatitis [5, 6]. Moreover, a chronic form mainly affecting heart-valves as well as a fatigue syndrome can occur [7, 8]. The most relevant infection route of Q fever is the inhalation of contaminated dusts or aerosols. Persons with close contact to

\*Correspondence: [Sebastian.ulbert@izi.fraunhofer.de](mailto:Sebastian.ulbert@izi.fraunhofer.de)

<sup>1</sup> Department of Immunology, Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology, Leipzig, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

infected domestic ruminants, such as farmers or veterinarians, may be at higher risk for acquiring this disease [9, 10].

*Coxiella burnetii* was first isolated from an infected *Dermacentor andersoni* tick [11] and was then isolated from 40 different tick species, including *Ixodes ricinus*, the most common tick in central Europe [12–15]. The tick *D. marginatus* in particular is considered to be a competent vector. The spatial distribution of this tick matches the increased occurrence of Q fever cases in southwest Germany [16, 17]. In early studies, the presence of *C. burnetii* in tick organs was examined by staining methods [18, 19]. With the introduction of PCR methods, several studies investigating the prevalence of tick-borne pathogens in Europe showed *C. burnetii* DNA in over 10% of the examined arthropods [20, 21]. Contrary, in other studies, no *C. burnetii*-specific DNA was detected in ticks [22–24]. In addition, tick feces samples were found to contain *C. burnetii* or DNA of this agent [17, 25]. However, recent research questioned the role of ticks in Q fever transmission. During the large Q fever outbreak in the Netherlands 2007–2010, ticks obtained from environment, pets, wildlife and livestock were tested, but no infected tick could be found, even from infected herds [26]. Thus, the risk of acquiring Q fever by ticks is commonly assessed as being low. Furthermore, *Coxiella*-like bacteria were discovered as primarily non-pathogenic tick endosymbionts [27, 28]. Their close genetic relationship to *C. burnetii* could have led to misidentifications by PCR [29, 30]. These partially contradictory findings demonstrate the need for further research on possible transmission routes of *C. burnetii* between different life stages of ticks and from ticks to their hosts.

To study blood-feeding and vector competence of hematophagous arthropods under controlled laboratory conditions, several *in vitro* feeding systems have been established [31–35]. These methods allow detailed analyses of blood-borne pathogen transmission *via* insect or tick vectors. In this study, the uptake, survival and transstadial transmission of *C. burnetii* in ticks, as well as excretion of the bacteria *via* feces, was analyzed using a membrane-based *in vitro* feeding system.

## Methods

### Ticks

Adult female and male *I. ricinus* and *D. marginatus* as well as *I. ricinus* nymphs were obtained from a laboratory colony (Insect Services, Berlin, Germany) at the age of 14 to 37 weeks after molting. The colonies were free of *Borrelia* spp. and *Rickettsia* spp. Until feeding, *I. ricinus* ticks were maintained at 4–8 °C and *D. marginatus* at room temperature at a relative humidity (RH) of >90%. At least

24 h before the beginning of tick feeding experiments, *I. ricinus* were moved to room temperature.

### Membrane production

Artificial tick feeding was performed in silicone-membrane sealed glass tubes following the protocol by Kröber and Guerin [36]. Briefly, the silicone mass was mixed according to the recipe published by Krull et al. [37] and spread out on lens cleaning tissue (Whatman, Maidstone, UK) with the rounded side of a gel releaser (Bio-Rad, Hercules, USA). Membranes were left to polymerize for at least 16 h at >95% RH. Membrane thickness was measured with the Inductive Dial Comparator 2000 (Mahr, Göttingen, Germany). Membranes with a thickness of 70–100 µm were used for the feeding of *I. ricinus* adults. *Ixodes ricinus* nymphs and adult *D. marginatus* were fed on membranes of 60–80 µm.

### Artificial feeding system

Sealed feeding units were made by gluing the silicone membrane with Elastosil E41 (Wacker Chemie, München, Germany) to borosilicate tubes of 50 mm length, 30 mm outer diameter, 28 mm inner diameter (Neubert Glas, Geschwenda, Germany). A square piece of mosquito netting (15 × 15 mm, Draht Driller, Freiburg, Germany) was loosely glued to the membrane [37] to stimulate the fixation of adult ticks. An extract of washed sheep wool (Alana, Karlsruhe, Germany) was prepared with dichloromethane (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) as described by Böhme [38]. Ninety µl of the extract (10 mg/ml) was added to the membrane of each feeding unit, which were subsequently allowed to dry for 2 h at room temperature before ticks were placed in the feeding unit [38].

### Feeding of adult *I. ricinus*

Blood used for feeding experiments was taken from the jugular vein of cattle (Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz, Bad Langensalza, Germany, registration no. 04-102/15) in heparinized blood vials (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Of this blood, 3.1 ml supplemented with glucose (2 g/l) were added to each well of a 6-well plate (Sarstedt). As a phagostimulant, 1 mmol/l ATP (Carl Roth) dissolved in physiological sodium chloride solution was added to the blood [39]. The plate was pre-warmed at 37 °C. Blood was changed every 10–14 h. The tick feeding units placed in the 6-well plates were incubated at 37 °C, a RH of >70% and a day–night regime with a cycle of 15 h light and 9 h darkness. All environmental factors were continuously monitored by a data logger (MSR, Seuzach, Switzerland). As a further stimulus, the CO<sub>2</sub> level was

increased to 2.5% [40]. Each feeding unit contained 7–9 female and 5 male *I. ricinus*.

During the first 12 h of each feeding experiment, ticks were fed on blood (without bacteria) for attachment before starting inoculation. For the infection experiments  $10^4$  (2 units),  $10^5$  (2 units) or  $10^6$  (5 units) genomic equivalents (GE)/ml of *Coxiella burnetii* Nine Mile phase II RSA 439 (obtained from the strain collection at Friedrich Löffler Institute Jena) were subsequently added to the wells of the feeding unit during every blood change, except for the mock infection control (2 units). In one of the experiments, attached females feeding on *Coxiella*-inoculated blood were removed from the membrane after 48 h of feeding and transferred to a fresh feeding unit in order to continue feeding on *Coxiella*-free blood (4 units). During each blood change, the membranes and ticks were inspected and feeding units were rinsed with warm 0.9% sodium chloride solution. Samples of tick feces of every feeding unit were removed daily with fine forceps and stored at 4 °C until further processing. Single ticks were removed during feeding at different days. Detached replete ticks were removed from the membrane, transferred to a 15 ml Falcon tube and individually stored at 21–23 °C, > 90% RH.

#### Feeding of *D. marginatus*

Blood for feeding of *D. marginatus* adults was prepared the same way as for *I. ricinus* adults. The experiments were performed with addition of  $10^6$  GE/ml *C. burnetii* in 4 feeding units or mock inoculation in 2 feeding units. Per feeding unit, 7 female and 5 male *D. marginatus* were used. Feeding chambers were incubated on a 38 °C heating plate with an ambient temperature of 28–30 °C. This provides a temperature gradient, resembling the animal skin and environmental temperatures. Blood change as well as storage of feces samples and engorged ticks was carried out as in *I. ricinus* adult experiments.

#### Feeding of *I. ricinus* nymphs

The feeding of *I. ricinus* nymphs was performed in the same setting as for *D. marginatus*. CO<sub>2</sub> was used at a concentration of 4% and the feeding units were covered with a moist piece of cotton wool to prevent desiccation of ticks. In each feeding unit, 50–60 nymphs were placed. One feeding unit remained as mock infected, whereas the other were constantly supplemented with  $10^6$  GE/ml throughout feeding. Blood change was performed similar to the adult feeding and engorged nymphs were removed and transferred to 1.5 ml tubes and maintained at 21–23 °C and a RH of over 90%. Shortly after

engorgement, 5 mock infected nymphs and 6 nymphs, which were exposed to *C. burnetii* were removed and tested by qPCR.

#### Cultivation of *Coxiella burnetii*

All experiments with *C. burnetii* Nine Mile Phase II RSA 439 were carried out under biosafety laboratory 2 conditions. *Coxiella burnetii* was cultivated in L-929 mouse fibroblasts, maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Life Technologies, Carlsbad, USA) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS; Life Technologies). Medium was changed weekly, and the cells were harvested after an average of two weeks when *Coxiella*-containing vacuoles were visible. Purification of bacteria from host cells was performed *via* needle purification using 22 G cannulas as smallest size according to [41], and genomic equivalent measurement was performed by quantitative real-time PCR as described below. *Coxiella burnetii* was stored in a 45 mM phosphate-buffered 0.25 M sucrose solution with 10% glycerol in aliquots at – 80 °C.

#### DNA isolation and quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR)

Female ticks from feeding experiments were stored in 70% ethanol at 4 °C. Prior to DNA-extraction, ticks were washed in PBS and dried. Every tick was weighed individually using a micro balance. In addition, feces per day and group were weighed in order to normalize the PCR results to the mass of feces. Lysis of ticks and feces was performed in a Tris-EDTA-lysozyme-buffer [42], containing 0.25 M Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA and 0.4% (w/v) lysozyme, with micropestles (Eppendorf, Wessling-Berzdorf, Germany) and in the case of ticks, an additional two rounds of centrifugation (14000×g, 5 min, 20 °C) in 1.5 ml tubes. After 4 h of lysis with 0.2 % (w/v) proteinase K at 56 °C, DNA extraction was performed according to the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Basel, Switzerland). In addition, DNA was extracted from 200 µl blood that was used to feed previously infected ticks with the same DNA extraction kit according to the whole blood protocol. Quantitative real-time PCR was performed with a Lightcycler 480 II (Roche) targeting the *C. burnetii* single-copy gene *icd* [43]. For each reaction 2 µl of template DNA or standard was used [44]. The program included 45 cycles of 15 s at 95 °C and 30 s at 60 °C. A cut-off for positivity was set to a Cq-value of 35, which was equal to 10 copies per reaction. For confirmation of DNA extraction in *I. ricinus*, a quantitative real-time PCR targeting the *I. ricinus* house-keeping genes *actin* and *elongation factor 2* was conducted using the primers described in [45].

### Isolation of *Coxiella burnetii* from feces

Tick feces samples originating from one group fed on blood inoculated with  $10^6$  GE/ml *C. burnetii* and from one mock infected group were weighed and used for cultivation in L-929 cells. Briefly, ninety-two mg feces from mock infected and 102 mg feces from infected ticks were dissolved in 10 ml DMEM containing 5% FCS, filtered through 0.45  $\mu$ m syringe filters (TPP, Trasadingen, Switzerland). From the filtrate, 4.5 ml were transferred to a 25 cm<sup>2</sup> flask (Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria) of confluent murine L-929 cells. The volume was then extended to 6 ml with DMEM containing 5% FCS. Medium was changed weekly, and cells were visually monitored at 400 $\times$  magnification. For PCR-based affirmation of the visible increase of vacuoles, every three days a square of approximately 1.5 cm<sup>2</sup> of the cell layer was removed with PBS (pH 7.4) using a cell scraper. Cells were centrifuged (15000 $\times$ g for 5 min at 4 °C) and the pellet resuspended in lysis buffer. DNA was extracted and *C. burnetii* DNA was quantified using the isocitrate dehydrogenase (*icd*) qPCR. For normalization the QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with the QuantiTect Primer for Ribosomal Protein L22 (*rpl22*) (Qiagen) targeting a mouse housekeeping gene was used, and the *icd* results were normalized to the average Cq values of *rpl22*.

### Isolation of *C. burnetii* from eclosed adults

Of the females molted from infected nymphs, two were bisected and qPCR was performed on one half whereas the other half was used for the cultivation of bacteria. For this purpose, halved ticks were suspended in 3 ml DMEM overnight before filtration through 0.45  $\mu$ m syringe filters. One ml of this filtrate was used for inoculation of L-929 cells whereas the remaining filtrate was centrifuged at 15000 $\times$ g for 5 min at 4 °C. Acidified citrate cysteine medium-2 (ACCM-2) was prepared as specified by the manufacturer (Sunrise Science, San Diego, USA). The pellet was resuspended in 2 ml ACCM-2 and placed into a 12-well plate. As a control, 2 ml ACCM-2 was inoculated with  $10^5$  GE/ml *C. burnetii* RSA 439. The cultures were incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> and 2.5% O<sub>2</sub> [46]. At day 1, 4 and 7, 100  $\mu$ l were removed and used for qPCR quantification of *C. burnetii*. Inoculated L-929 cells were visually examined biweekly for signs of *Coxiella* containing vacuoles.

### Reinfection experiment

In order to examine transstadial transmission, females, which were fed as nymphs on *Coxiella*-containing blood, were fed with blood without *C. burnetii*. Therefore, two groups of 4 females and 3 males each were used. An additional uninfected group of the same composition

was used as a negative control. Small feeding units (20  $\times$  2.5  $\times$  25 mm) were used in a 12-well-plate with 1 ml blood supplemented with 2 g/l glucose and of 1 mM ATP. During each blood change, 200  $\mu$ l of blood was collected for qPCR analysis. Feces were removed every second day and also tested by qPCR and cultivation in L-929 cells.

### Statistical analysis

Data were analyzed using Excel to calculate the mean and standard deviation. SPSS Statistics V22.0 was used for performing unpaired two-tailed t-tests and Mann–Whitney U-tests, depending on data distribution. Pearson's Chi-square test was performed for analysis of the engorgement rates. *P*-values <0.05 were considered statistically significant.

## Results

### Behavior of *I. ricinus* and *D. marginatus* in the *in vitro* feeding assay

In five independent experiments a total number of 141 female *I. ricinus* were fed. Within the first 24 h of feeding, 58  $\pm$  12% (mean  $\pm$  standard deviation) of female *I. ricinus* ticks attached to the membrane. The attachment rate varied in different experiments between 84% and 100% at day 4. An engorgement rate of 49  $\pm$  15% was achieved after 14.5  $\pm$  3.1 days, as shown in Table 1. Adults feeding on inoculated blood took longer as for those taking an uninfected blood meal, but the difference was not statistically significant (Mann-Whitney U-test, *U* = 41.5, *Z* = -1.453, *P* = 0.157).

Visible feces production of ticks started at day 2 post-attachment. For DNA extraction, up to 40 mg of daily pooled feces per feeding group was used. During the rapid engorgement phase, which occurred after approximately 10 days of *in vitro* feeding, feces production decreased and the ticks engorged to an average weight of 186.2  $\pm$  61.8 mg (average initial weight 2 mg).

The *in vitro* feeding assay was also established for *D. marginatus*. In two independent experiments fixation rates of 25% and 33% at day 4 and an engorgement rate of 29% (8 of 28 female *D. marginatus*) in both experiments were observed. This engorgement rate is lower than the one of *I. ricinus* adults, but the difference was not statistically significant ( $\chi^2 = 3.798$ , *df* = 1, *P* = 0.051). The engorgement weight was 414.6  $\pm$  136.7 mg (average initial weight 8 mg) and engorged females had fed for an average of 14.8  $\pm$  3.4 days. The engorgement weight of *D. marginatus* was significantly higher than the weight of engorged *I. ricinus* ( $t_{(43)} = -5.356$ , *P* < 0.001). It was also noticed that females often detached and reattached during feeding.

Feeding was also performed with a total number of 200 *I. ricinus* nymphs. Approximately 50% of the nymphs

**Table 1** *In vitro* feeding of ticks

Species	Life stage	Engorgement rate (%)	Engorgement weight (mg)	Duration of feeding (days)	Time until oviposition	Molting rate (%)
<i>Ixodes ricinus</i>	Adults	49 ± 15	186.2 ± 61.8	14.5 ± 3.1	14.7 ± 4.9 days <sup>a</sup>	–
	Nymphs	~50	3.0 ± 1.0	7.9 ± 1.8	10 ± 5 weeks	92
<i>Dermacentor marginatus</i>	Adults	29	414.6 ± 136.7	14.8 ± 3.4	4 days <sup>b</sup>	–

<sup>a</sup> Days until oviposition of *I. ricinus* were calculated from 15 egg-laying ticks

<sup>b</sup> In the *D. marginatus* experiment, only 1 tick laid eggs after 4 days

Notes: Feeding parameters of *in vitro* experiments with *I. ricinus* adults and nymphs and *D. marginatus* adults (mean values ± standard deviation)

engorged to an average weight of 3.0 ± 1.0 mg (average weight of unfed nymphs: 0.48 ± 0.31 mg) (Table 1). The remaining nymphs did not attach to the membrane or did not fully engorge. Nymphs fully engorged within 7.9 ± 1.8 days. After removal of 11 nymphs for PCR testing, within 10 ± 5 weeks 92% (82/89) of the engorged nymphs molted into adults, of which 59% were females.

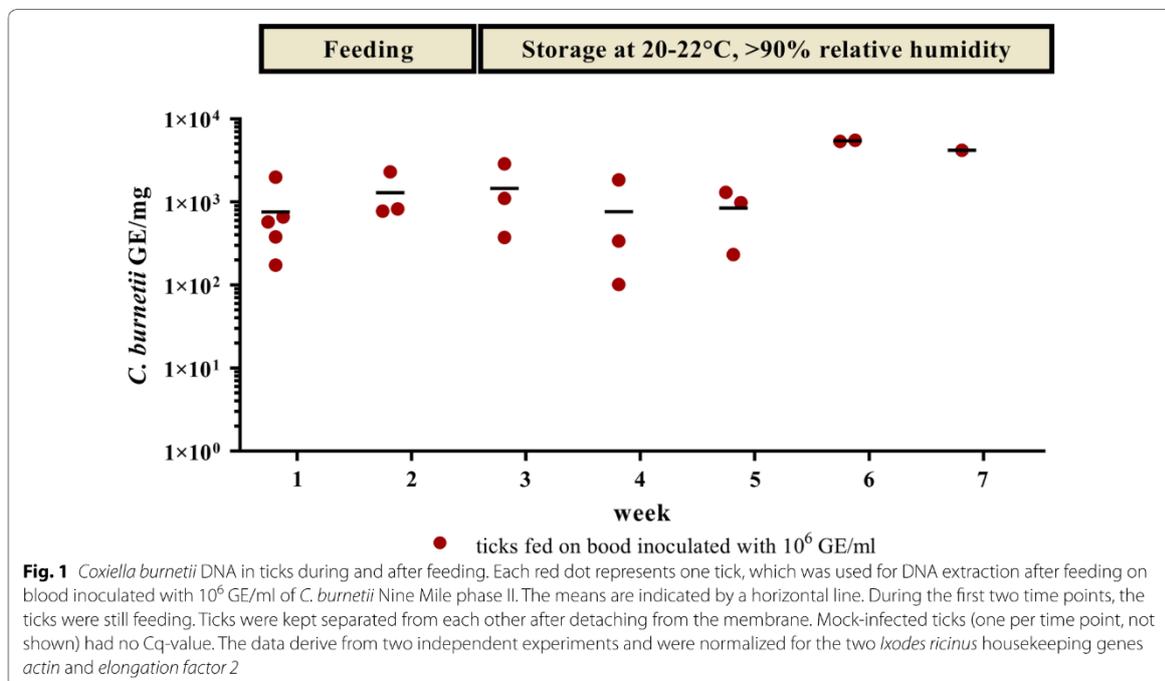
**Infected *I. ricinus* can carry *C. burnetii* for at least seven weeks**

To analyze the uptake of *C. burnetii* by ticks in the feeding system, 2–4 *I. ricinus* females exposed to 10<sup>6</sup> GE/ml containing blood and one female tick exposed to negative blood were tested weekly for the presence of *Coxiella*-DNA, starting one week after beginning of feeding.

A slight but statistically not significant ( $t_{(6)} = -0.969$ ,  $P = 0.370$ ) increase in *C. burnetii* DNA load was detected during feeding, i.e. in the first two weeks (Fig. 1). In all the female *I. ricinus* that fed on inoculated blood DNA of *C. burnetii* was found (ranging from 10<sup>2</sup> to 10<sup>3</sup> GE/mg) up to 5 weeks after feeding. In contrast, ticks feeding on negative blood remained *C. burnetii* negative (data not shown).

***Coxiella burnetii* is excreted via feces by adult *I. ricinus* and *D. marginatus***

*Coxiella burnetii* DNA could readily be detected in feces of groups feeding on blood inoculated with 10<sup>6</sup> GE/ml, but a decrease of the DNA content was observed after 3 days. However, after 9 days of feeding,



the amount of *C. burnetii* DNA increased again. The DNA load at day 11 differed significantly from the DNA loads at the days 4–10 (e.g.  $t_{(8)} = -4.631$ ,  $P = 0.009$  at day 5;  $t_{(8)} = -2.768$ ,  $P = 0.024$  at day 10). Feces of ticks fed on  $10^5$  GE/ml *Coxiella*-containing blood displayed a similar time-dependent excretion of bacteria (Fig. 2a), whereas a dose of  $10^4$  GE/ml was not sufficient to obtain *Coxiella* DNA-containing feces. In *D. marginatus*, feces excretion started between day 3 and 6. In comparison to *I. ricinus*, larger amounts of feces were deposited, and also male *D. marginatus* attached and defecated for longer time periods. Similar to *I. ricinus*, in the feces samples examined by PCR the bacterial DNA load was highest between day 11 and 12 with up to  $2 \times 10^3$  GE per milligram feces (Fig. 2b) and was significantly different to the days 6 ( $t_{(3)} = 3.508$ ,  $P = 0.039$ ), 7 ( $t_{(4)} = -3.413$ ,  $P = 0.027$ ) and 9 ( $t_{(4)} = -3.024$ ,  $P = 0.039$ ).

To test whether shorter feeding periods would be sufficient for the excretion of *C. burnetii* via feces, the experimental setup was modified: *I. ricinus* were allowed to feed on *C. burnetii*-spiked blood for 36 h before being transferred to another unit where they continued feeding on bacteria-free blood. Here, a similar increase of *C. burnetii* DNA after approximately 11 days was observed in the feces (Fig. 2c), although the differences were not statistically significant.

Next, we investigated whether the *C. burnetii* DNA in the tick feces derived from viable bacteria. Feces samples taken at day 10 from ticks fed on blood containing  $10^6$  GE/ml (transferred to non-infected blood after 36 h, see above) were inoculated to L-929 cells. Samples from *Coxiella* negative blood-feeding were used as controls. In the cells incubated with feces from *C. burnetii* exposed ticks, first microscopically visible vacuoles appeared at day 18 after inoculation (Fig. 3a) and an increase in vacuoles was visible within the following ten days. At day 20, 23 and 26 after inoculation cells were harvested and analyzed by real-time PCR. An increase of *Coxiella* DNA in relation to the DNA of mouse fibroblasts (L-929) could be detected (Fig. 3b), whereas the flask inoculated with feces of negative controls remained free of *Coxiella* DNA. These data show that *C. burnetii* excreted in the feces from ticks feeding on infected blood are viable.

#### ***Coxiella burnetii* is transstadially transmitted from *I. ricinus* nymphs to adults**

In order to examine transstadial transmission of *C. burnetii*, *I. ricinus* nymphs were infected with  $10^6$  GE/ml using the *in vitro* feeding system. Via qPCR, uptake of *Coxiella* DNA was confirmed by testing 6 previously infected nymphs, whereas 5 mock infected nymphs remained negative. Two weeks after molting, 40 adults,

which were fed on *C. burnetii* inoculated blood as nymphs, and 26 adults fed on negative blood were tested by real-time PCR. Of the nymphs which were fed on inoculated blood 25% were positive for *C. burnetii* DNA. One female tick was bisected and one half was analyzed for *C. burnetii* DNA by PCR. The Cq-value was 22.69. After inoculation of axenic medium and L-929 cells with a filtrate of the other half of the tick, growth of *C. burnetii* in both settings was observed (Fig. 4a, b).

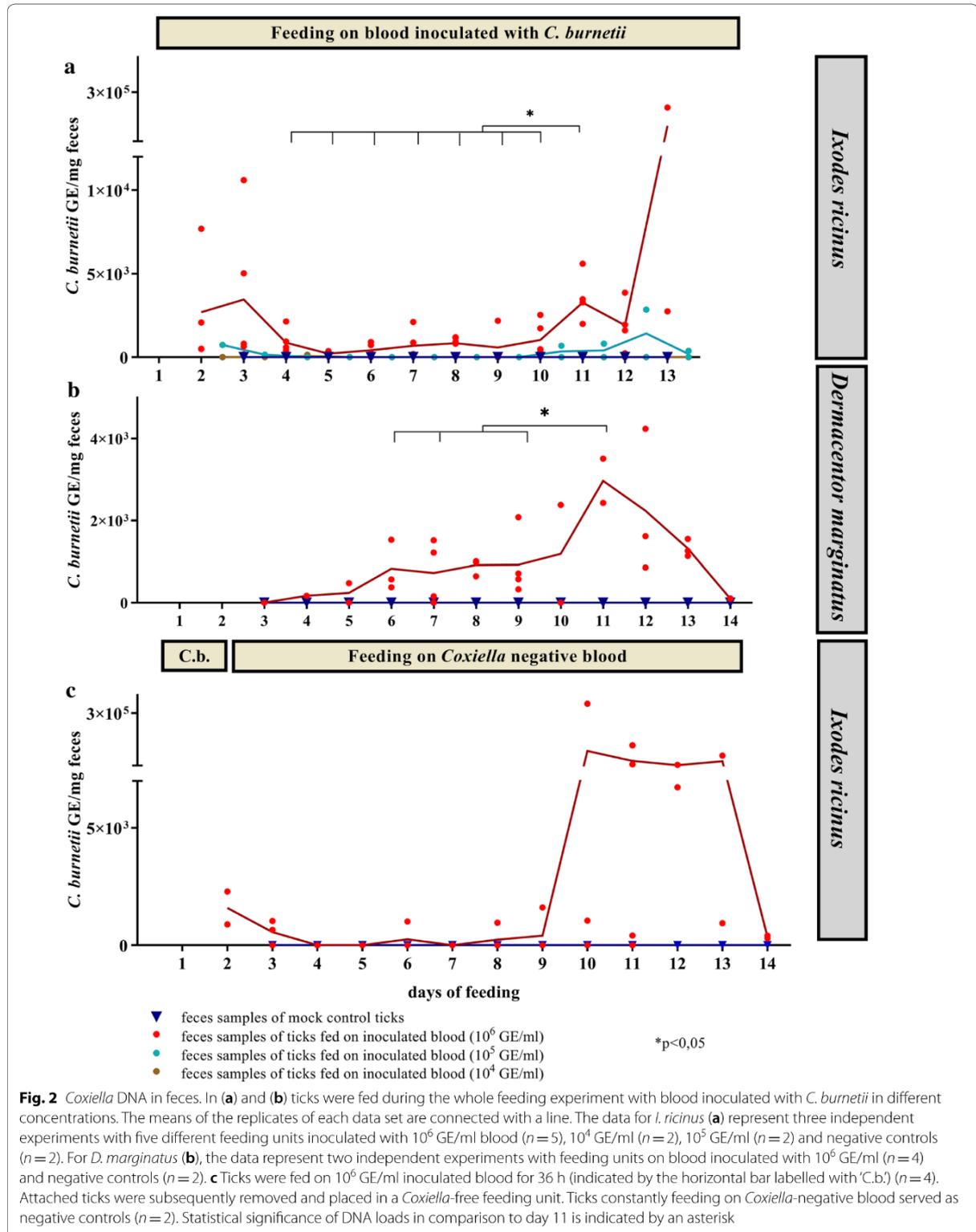
#### ***Coxiella burnetii* can be excreted via feces by adult ticks infected as nymphs**

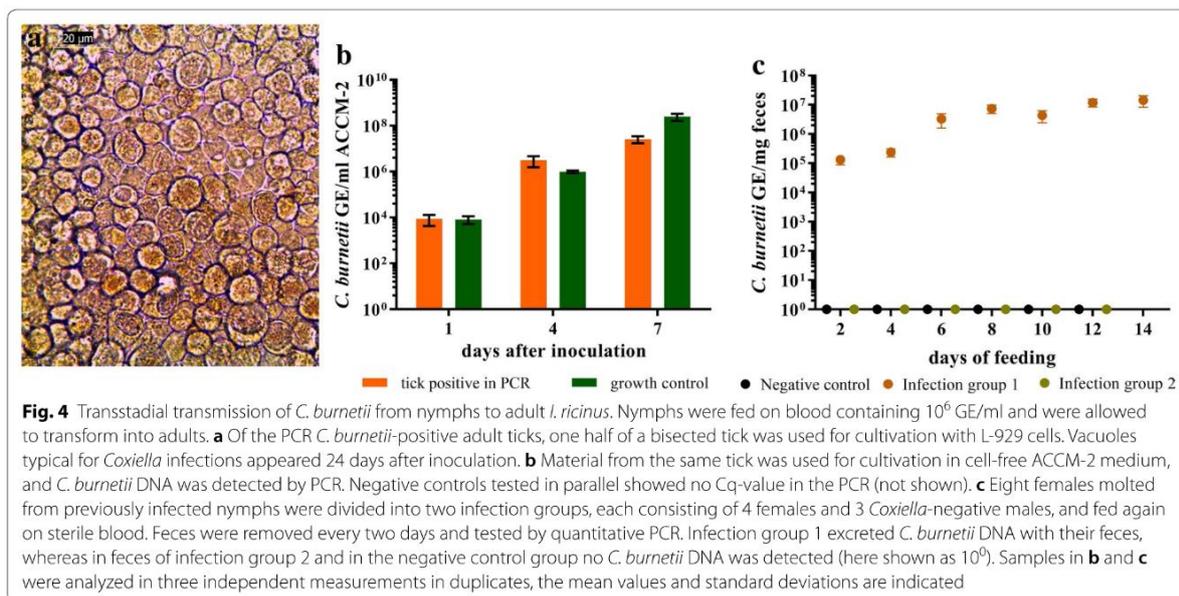
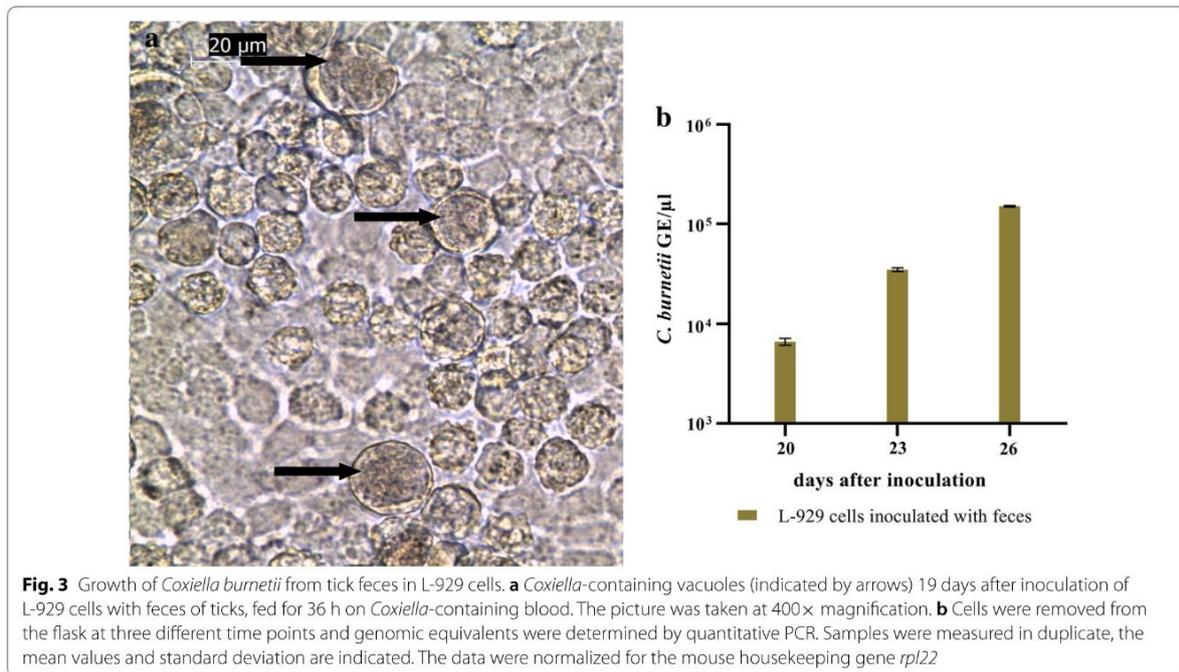
Eight female ticks which were fed with *C. burnetii* as nymphs were divided into two groups and fed again on sterile blood. In this reinfection experiment, all negative control ticks and 3 out of 4 ticks of each infection group were attached. In one of the infection groups, *C. burnetii* DNA was detected in feces at every time point, revealing an increasing DNA concentration up to  $6 \times 10^6$  GE/mg feces (Fig. 4c). The bacteria contained in the feces were infective as verified by culture in L-929 cells and PCR (Cq = 25.39) at day 21 post-inoculation. These results suggest that *C. burnetii* is transmitted transstadially from *I. ricinus* nymphs to adults and that infected adults excrete the bacteria with their feces during feeding on a non-infected host. Samples of blood on which these ticks had fed were tested at 7 different time points during the first 7 days of feeding, but *Coxiella* DNA was not detected.

#### **Discussion**

The significance of ticks as potential vectors for *C. burnetii* is still under debate. Several laboratory-based studies have revealed that many tick species get infected upon feeding on *C. burnetii* positive animals and that they carry the bacterium into their next developmental life stage. In addition, transmission of *C. burnetii* to non-infected laboratory animals by ticks has been demonstrated [47]. Besides these principle findings, many questions remain unresolved, including the most significant mechanism of infection (e.g. via feces or saliva) or the effectiveness of transstadial transmission. It is important to investigate these aspects of *C. burnetii* in ticks, in order to fully understand the role these arthropods play in the epidemiology of Q fever.

In this study, we have investigated uptake of *C. burnetii* by *I. ricinus* and *D. marginatus* via blood-feeding. By using an artificial membrane feeding system it could be demonstrated that *I. ricinus* becomes infected by feeding on bacteria-containing blood and that the bacteria are detectable within the ticks for at least seven weeks. The feces, which are constantly being deposited during





blood-feeding, contain viable *C. burnetii*. This excretion of *C. burnetii* was shown to be time dependent, as a peak of bacteria in feces was detectable at approximately 11 days upon start of feeding. The amount of *C. burnetii* found in the ticks and in their feces also correlated with

the concentration of the bacteria in the blood, and was highest when feeding with 10<sup>6</sup> GE/ml blood, the highest concentration used in this study. Titers of 10<sup>6</sup> are commonly found in blood of humans with an acute Q fever infection [48]. Lower titers, 10<sup>5</sup> GE/ml blood, created a

similar bacteria excretion profile, whereas in the 10<sup>4</sup> GE/ml-group *C. burnetii* DNA could not be detected, indicating the need of a highly bacteremic host for excretion *via* feces.

The appearance of *C. burnetii* in tick feces 9 days after start of feeding on infected blood suggests a replication of *C. burnetii* in the cells of the midgut, confirming earlier studies [19, 25]. At the same time, we cannot exclude that this increase was in part or completely caused by the secretion of more concentrated feces during this period.

Tick feces are known as a potential source for infection *via* inhalation of infected dusts [49]. Our data suggest that, at least for *I. ricinus* and *D. marginatus*, tick feces are not always infectious but that the amount of active *C. burnetii* in feces strongly increases towards the end of the feeding period, provided that the tick was not already infected with *C. burnetii* before the blood meal (see below).

The use of an *in vitro* feeding system allows for well-controlled experimental conditions, especially for analyzing the effects of bacterial concentration and duration of feeding. In addition, no infection experiments with mammalian hosts are required. By using guinea pigs as hosts, Siroky et al. [50] demonstrated the principle vector competence of *Hyalomma aegyptium* for *C. burnetii*. However, the exact mechanisms of transmission could not be analyzed, which is possible with *in vitro* systems such as the one used in our study.

Our results demonstrate that adult ticks which became infected with *C. burnetii* as nymphs, contain viable bacteria and excrete them *via* feces during feeding on non-infected blood. This excretion of bacteria followed a different time course and contained higher concentrations as compared to non-infected ticks feeding on infected blood. DNA of *C. burnetii* was present in high concentrations from the start of feeding and did constantly increase during the blood meal. At the same time no bacterial DNA could be detected in the blood used for feeding of these adults. Although we cannot exclude that minimal amounts of *Coxiella* were secreted into the blood, given the detection limit of 10 GE per reaction [41], this finding might indicate that the primary route of transmission of *C. burnetii* by ticks is *via* feces. In the field, this transmission could occur in several ways. Dried feces can form infectious dusts which are inhaled by one or more potential hosts. Additionally, the feces can contaminate the bite wound caused by the tick, similar to transmission of the parasite *Trypanosoma cruzi* by reduviid bugs [51]. Likewise, *Rickettsia prowazekii*, the etiological agent of louse-borne epidemic typhus is only excreted through feces and not *via* saliva. The infection consequently takes place when the itching sting is scratched and the pathogen rubbed into the skin [52].

Also, the amount of feces might have influence on transmission efficiency. *Dermacentor marginatus* deposits larger amounts than *I. ricinus*, as observed by us (data not shown) and others [38], thereby secreting more bacteria.

From the *I. ricinus* nymphs which were fed on *C. burnetii*-infected blood, only about 25% were positive for the bacteria after molting into adults. This is in accordance to Siroky et al. [50], where 29% of adults which as larvae fed on *C. burnetii*-positive guinea pigs were infected. The result is also similar to data obtained with *in vitro* feeding systems and the tick-borne pathogens *Rickettsia monacensis* and *Anaplasma phagocytophilum* [35]. It indicates that transstadial transmission is not 100% efficient, but that roughly one out of four nymphs feeding on an infected host is able to transmit *C. burnetii* as an adult, under the selected experimental conditions. Accordingly, in our study, bacterial DNA in the feces was found only in one out of two experimental groups during the feeding of adults which were infected as nymphs. These results might contribute to the observation that ticks do not play a major role in transmitting Q fever in the field, although in principle they are competent vectors [47].

Our experiments were conducted with the Phase II Nine Mile strain of *C. burnetii*. This strain is non-pathogenic to humans due to a different LPS-structure when compared to the virulent Phase I strain [14]. The Phase II bacteria were chosen due to safety issues, as performing the *in vitro* assays requires extensive direct handling of infected ticks and their feces. However, we cannot exclude that the differences in surface structures could influence the behavior of the bacteria in the tick or in this *in vitro* feeding system. Therefore, key findings of our study should be repeated using virulent *C. burnetii* strains.

## Conclusions

This study provides evidence that the tick species *I. ricinus* and *D. marginatus* secrete viable *C. burnetii* *via* feces when feeding on infected blood. Moreover, approximately 25% of *I. ricinus* that became infected in the nymph stage still contained *C. burnetii* as adults and shed bacteria with their feces upon feeding on non-infected blood. As no *C. burnetii* was detected in the blood these adults fed on, our data support the idea that secretion *via* feces is a possible mechanism by which ticks can distribute and transmit *C. burnetii*.

## Abbreviations

ACCM: acidified citrate cysteine medium; GE: genomic equivalents; icd: isocitrate dehydrogenase; PBS: phosphate-buffered saline; PCR: polymerase chain reaction; RH: relative humidity; rpl22: ribosomal protein L22.

**Acknowledgements**

We thank Steffen Jakob and Ulrike Ehlert for the excellent technical assistance.

**Authors' contributions**

SK performed the experiments. AMN and AS contributed to the design of the study. SU, GRM, KMS, SK and KH designed the study and interpreted the results. SU and SK wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

**Funding**

This study was supported by the German Federal Ministry for Education and Research (BMBF) via the Research Network of Zoonotic Infectious Diseases, project Q-GAPS (Q fever - German Interdisciplinary Program for Research), grant number 01KI1726G and 01KI1726C. AMN received financial support from the BMBF as part of the Junior Research Group 'Tick-borne Zoonoses' with grant number 01KI1720.

**Availability of data and materials**

All data generated or analysed during this study are included in this published article.

**Ethics approval and consent to participate**

Usage of bovine blood was approved by the Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz, Germany, registration No. 04-102/15.

**Consent for publication**

Not applicable.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Author details**

<sup>1</sup> Department of Immunology, Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology, Leipzig, Germany. <sup>2</sup> Institute of Bacterial Infections and Zoonoses (IBIZ), Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Jena, Germany. <sup>3</sup> Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Leipzig, Germany. <sup>4</sup> Clinic for Ruminants and Swine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany. <sup>5</sup> Institute for Parasitology and Tropical Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany.

Received: 14 November 2019 Accepted: 10 February 2020

Published online: 14 February 2020

**References**

- Jones RM, Nicas M, Hubbard AE, Reingold AL. The infectious dose of *Coxiella burnetii* (Q fever). *Appl Biosaf*. 2006;11:32–41.
- van Schaik EJ, Chen C, Mertens K, Weber MM, Samuel JE. Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11:561–73.
- Roest HJ, van Gelderen B, Dinkla A, Frangoulidis D, van Zijderveld F, Rebel J, et al. Q fever in pregnant goats: pathogenesis and excretion of *Coxiella burnetii*. *PLoS ONE*. 2012;7:48949.
- Gache K, Rousset E, Perrin JB, De Cremoux R, Hosteing S, Jourdain E, et al. Estimation of the frequency of Q fever in sheep, goat and cattle herds in France: results of a 3-year study of the seroprevalence of Q fever and excretion level of *Coxiella burnetii* in abortive episodes. *Epidemiol Infect*. 2017;145:3131–42.
- Marrie TJ. *Coxiella burnetii* pneumonia. *Eur Respir J*. 2003;21:713–9.
- Jang YR, Shin Y, Jin CE, Koo B, Park SY, Kim MC, et al. Molecular detection of *Coxiella burnetii* from the formalin-fixed tissues of Q fever patients with acute hepatitis. *plos ONE*. 2017;12:0180237.
- Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12:518–53.
- Morroy G, Keijmel SP, Delsing CE, Bleijenberg G, Langendam M, Timen A, et al. Fatigue following acute Q fever: a systematic literature review. *PLoS ONE*. 2016;11:0155884.
- Fenga C, Gangemi S, De Luca A, Calimeri S, Lo Giudice D, Pugliese M, et al. Seroprevalence and occupational risk survey for *Coxiella burnetii* among exposed workers in Sicily, southern Italy. *Int J Occup Med Environ Health*. 2015;28:901–7.
- Meadows SL, Jones-Bitton A, McEwen SA, Jansen J, Patel SN, Filejski C, et al. Prevalence and risk factors for *Coxiella burnetii* seropositivity in small ruminant veterinarians and veterinary students in Ontario, Canada. *Can Vet J*. 2017;58:397–9.
- Davis GE, Cox HR. A filter-passing infectious agent isolated from ticks. Isolation from *Dermacentor andersonii*, reactions with animals, and filtration experiments. *Publ Health Rep*. 1938;53:2259–76.
- Kaaserer B, Rehacek J, Urvögly J, Kovacova E, Lukacova M, Kocianova E. Erst-isolation des Q-Fieber Erregers *Coxiella burnetii* aus *Ixodes ricinus*-Zecken in Tirol (Österreich). *Verein Innsbruck*. 1994;81:223–7.
- Spitalská E, Kocianová E. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected in Slovakia and Hungary. *Eur J Epidemiol*. 2003;18:263–6.
- Angelakis E, Raoult D. Q fever. *Vet Microbiol*. 2010;140:297–309.
- Rizzoli A, Silaghi C, Obiegala A, Rudolf I, Hubálek Z, Földvári G, et al. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. *Front Public Health*. 2014;2:251.
- Liebisch A. Das Q-Fieber als Naturherdinfektion in Süddeutschland. *Bundesgesundheitsblatt*. 1977;20:185–91.
- Sting R, Breitling N, Oehme R, Kimmig P. Untersuchungen zu Vorkommen von *Coxiella burnetii* bei Schafen und Zecken der Gattung *Dermacentor* in Baden-Württemberg. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 2004;111:390–4.
- Kordova N, Rehacek J. Experimental infection of ticks *in vivo* and their organs *in vitro* with filterable particles of *Coxiella burnetii*. *Acta Virol*. 1959;3:201–9.
- Zupancicová-Majerska M, Rehacek J, Kováčová E. Localization of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* of the Rocky Mountain spotted fever group in ticks. *Acta Virologica*. 1972;16:63–70.
- Bonnet S, de la Fuente J, Nicollet P, Liu X, Madani N, Blanchard B, et al. Prevalence of tick-borne pathogens in adult *Dermacentor* spp. ticks from nine collection sites in France. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2013;13:226–36.
- Szymańska-Czerwińska M, Galińska EM, Niemczuk K, Zasepa M. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in foresters and ticks. *Ann Agric Environ Med*. 2013;20:699–704.
- Reye AL, Hübschen JM, Sausy A, Muller CP. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76:2923–31.
- Schötta AM, Wijnveld M, Stockinger H, Stanek G. Approaches for reverse line blot-based detection of microbial pathogens in *Ixodes ricinus* ticks collected in Austria and impact of the chosen method. *Appl Environ Microbiol*. 2017;83:00489-17.
- Piilloux L, Baumgartner A, Jaton K, Lienhard R, Ackermann-Gäumann R, Beuret C, et al. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Coxiella burnetii* in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland: an underestimated epidemiologic risk. *N Microb N Infect*. 2018;27:22–6.
- Smith DJW. Studies in the epidemiology of Q fever. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1941;19:133–6.
- Sprong H, Tijssen-Klasen E, Langelaar M, De Bruin A, Fonville M, Gassner F, et al. Prevalence of *Coxiella burnetii* in ticks after a large outbreak of Q fever. *Zoonoses Public Health*. 2012;59:69–75.
- Duron O. The IS1111 insertion sequence used for detection of *Coxiella burnetii* is widespread in *Coxiella*-like endosymbionts of ticks. *FEMS Microbiol Lett*. 2015;362:132.
- Machado-Ferreira E, Vizzoni VF, Balsemão-Pires E, Moerbeck L, Gazeta GS, Piesman J, et al. *Coxiella* symbionts are widespread into hard ticks. *Parasitol Res*. 2016;115:4691–9.
- Duron O, Noël V, McCoy KD, Bonazzi M, Sidi-Boumedine K, Morel O, et al. The recent evolution of a maternally-inherited endosymbiont of ticks led to the emergence of the Q fever pathogen, *Coxiella burnetii*. *PLoS Pathog*. 2015;11:1004892.
- Elsa J, Duron O, Séverine B, González-Acuña D, Sidi-Boumedine K. Molecular methods routinely used to detect *Coxiella burnetii* in ticks cross-react with *Coxiella*-like bacteria. *Infect Ecol Epidemiol*. 2015;5:29230.
- Bauer B, Wetzel H. A new membrane for feeding *Glossina morsitans* Westw (Diptera, Glossinidae). *Bull Entomol Res*. 1976;64:563–5.

32. Waladde SM, Young AS, Morzaria SP. Artificial feeding of ixodid ticks. *Parasitol Today*. 1996;12:272–8.
33. Makert GR, Vorbrüggen S, Krautwald-Junghanns ME, Voss M, Sohn K, Buschmann T, et al. A method to identify protein antigens of *Dermanyssus gallinae* for the protection of birds from poultry mites. *Parasitol Res*. 2016;115:2705–13.
34. Fourie JJ, Stanneck D, Luus HG, Beugnet F, Wijnveld M, Jongejan F. Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. *Vet Parasitol*. 2013;197:595–603.
35. Oliver JD, Lynn GE, Burkhardt NY, Price LD, Nelson CM, Kurtti TJ, et al. Infection of immature *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) by membrane feeding. *J Med Entomol*. 2016;53:409–15.
36. Kröber T, Guerin PM. *In vitro* feeding assays for hard ticks. *Trends Parasitol*. 2007;23:445–9.
37. Krull C, Böhme B, Clausen PH, Nijhof AM. Optimization of an artificial tick feeding assay for *Dermacentor reticulatus*. *Parasit Vectors*. 2017;10:60.
38. Böhme B. *In-vitro*-Fütterung von *Dermacentor reticulatus* und *Ixodes ricinus* und Entwicklung eines teilautomatisierten Fütterungssystems für Schildzecken. Doctoral dissertation. Freie Universität, Berlin; 2016.
39. Soares SF, Louly CC, Marion-Poll F, Ribeiro MF, Borges LM. Study on cheliceral sensilla of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) involved in taste perception of phagostimulants. *Acta Trop*. 2013;126:75–83.
40. Voigt WP, Young AS, Mwaura SN, Nyaga SG, Njihia GM, Mwakima FN, et al. *In vitro* feeding of instars of the ixodid tick *Amblyomma variegatum* on skin membranes and its application to the transmission of *Theileria mutans* and *Cowdria ruminantium*. *Parasitology*. 1993;107:257–63.
41. Samuel JE, Hendrix LR. Laboratory maintenance of *Coxiella burnetii*. *Curr Protoc Microbiol*. 2009;Chapter 6:Unit 6C.1.
42. Brennan RE, Samuel JE. Evaluation of *Coxiella burnetii* antibiotic susceptibilities by real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2003;41:1869–74.
43. Klee SR, Tyczka J, Ellerbrok H, Franz T, Linke S, Baljer G, et al. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiol*. 2006;6:2.
44. Dresler J, Klimentova J, Pajer P, Salovska B, Fucikova AM, Chmel M, et al. Quantitative proteome profiling of *Coxiella burnetii* reveals major metabolic and stress differences under axenic and cell culture cultivation. *Front Microbiol*. 2019;10:2022.
45. Honig Mondekova H, Sima R, Urbanova V, Kovar V, Rego ROM, Grubhofer L, et al. Characterization of *Ixodes ricinus* fibrinogen-related proteins (Ixoderins) discloses their function in the tick innate immunity. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:509.
46. Omsland A, Cockrell DC, Howe D, Fischer ER, Virtaneva K, Sturdevant DE, et al. Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:4430–4.
47. Duron O, Sidi-Boumedine K, Rousset E, Moutailler S, Jourdain E. The importance of ticks in Q fever transmission: what has (and has not) been demonstrated? *Trends Parasitol*. 2015;31:536–52.
48. Panning M, Kilwinski J, Greiner-Fischer S, Peters M, Kramme S, Frangoulidis D, et al. High throughput detection of *Coxiella burnetii* by real-time PCR with internal control system and automated DNA preparation. *BMC Microbiol*. 2008;8:77.
49. Schliesser T. Epidemiology and importance of Q fever in German livestock. *Wien Tierärztl Monat*. 1991;78:7–12.
50. Siroký P, Kubelová M, Modrý D, Erhart J, Literák I, Spitalská E, et al. Tortoise tick *Hyalomma aegyptium* as long term carrier of Q fever agent *Coxiella burnetii*-evidence from experimental infection. *Parasitol Res*. 2010;107:1515–20.
51. Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*. 2001;31:472–81.
52. Bechah Y, Capo C, Mege JL, Raoult D. Epidemic typhus. *Lancet Infect Dis*. 2008;8:417–26.

#### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



#### 4 Diskussion

Q-Fieber hat als Zoonose große Relevanz für die Gesundheit von Menschen und Tieren. Das detaillierte Verständnis der Epidemiologie der Erkrankung ist demnach unerlässlich, auch im Hinblick auf potenzielle Monitoring- und Bekämpfungsstrategien.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Literaturdatenbanken systematisch nach Prävalenz- und Vektorkompetenzstudien zum Thema *C. burnetii* in Zecken in Europa durchsucht und die gefundenen Studien ausgewertet. Ziel dieser Arbeit war es weiterhin, die Vektorkompetenz zweier heimischer Zeckenspezies mithilfe eines artifiziellen Fütterungssystems zu evaluieren.

In der Auswertung der Studien der letzten 20 Jahre zum Thema Q-Fieber in Zecken in Europa stellte sich ein Gefälle der durchschnittlichen Prävalenz von Süd nach Nord dar. Dabei wurde in Studien im Mittelmeerraum eine signifikant höhere Prävalenz im Vergleich zu Studien in Westeuropa festgestellt. Dies kann mit dem erhöhten Vorkommen von Zecken der Gattungen *Hyalomma* spp. und *Rhipicephalus* spp. in Südeuropa zusammenhängen. Der Eintrag dieser Zeckenspezies nach Deutschland vor dem Hintergrund von Klimawandel und erhöhter Reise-tätigkeit sollte daher kritisch beobachtet werden (CHITIMIA-DOBLER et al. 2019). Allerdings sind insbesondere diese beiden Gattungen auch bekannt dafür, in hohem Maße CLE in sich zu tragen (MACHADO-FERREIA et al. 2016, BEN-YOSEF et al. 2020). In den ausgewerteten Studien wurden positive Ergebnisse jedoch nur zu einem kleinen Teil sequenziert, wodurch nicht mit Sicherheit bestimmt werden kann, ob es sich bei den Nachweisen tatsächlich um *C. burnetii* handelt. Zwischen den in den ausgewerteten Studien verwendeten Zielgenen für den molekularen Nachweis wurden keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen. Es wurden in der Literatur in CLE-infizierten und *C. burnetii*-freien Zecken Nachweise üblicher Zielgene, wie IS1111 und *icd*, erzielt (DURON 2015, JOURDAIN et al. 2015). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Nachweise der üblichen Gensequenzen nicht spezifisch für *C. burnetii* sind und es zu einer Fehlinterpretation von CLE als *C. burnetii* und damit zur Überbewertung der Rolle der Zecken als Vektoren kommen kann. Für die Bewertung der Relevanz von Zecken in der Epidemiologie von Q-Fieber ist daher die genaue Planung der Studien und deren kritische Auswertung unerlässlich. Dabei ist insbesondere auf die Auswahl der Methoden zu achten; so sollten mehrere Zielgene verwendet und positive Proben sequenziert werden. Bisher gibt es außer der Sequenzierung keine Methode, die eine valide Unterscheidung zwischen *C. burnetii* und CLE zulässt. Daher sollte die Etablierung spezifischer Nachweismethoden, welche insbesondere auch für das Screening einer hohen Probenzahl geeignet sind, einen wesentlichen Aspekt zukünftiger Forschung darstellen.

Die Bedeutung von CLE als Symbionten für Zecken ist nachgewiesen, doch über die Relevanz der CLE als Pathogene ist bisher wenig bekannt. So werden sie überwiegend als apathogen eingeschätzt, dennoch konnte ihnen eine Beteiligung an Tiererkrankungen sowie Hautinfektionen nachgewiesen werden (ANGELAKIS et al. 2016, FLANDERS et al. 2017). BRENNER et al. (2020) zeigten mittels Sequenzierung, dass die Vorfahren der in der Lederzecke *Ornithodoros amblyus* symbiontisch lebenden CLE in der Lage gewesen sein mussten, Immunzellen zu infizieren. Anderen Untersuchungen zufolge hat *C. burnetii* seinen phylogenetischen Ursprung in apathogenen CLE (DURON et al. 2015a). Die Unterscheidung zwischen CLE und *C. burnetii* kann daher auch für die Einschätzung des pathogenen Potentials der Symbionten von Relevanz sein.

Die unterschiedliche Verteilung der Prävalenzen auch innerhalb einzelner Länder über die verschiedenen Studien hinweg legt weiterhin nahe, dass sich infizierte Zecken möglicherweise in räumlich eng begrenzten Hot-Spots konzentrieren. LIEBISCH (1977) stellte die Hypothese auf, dass *C. burnetii* eine solche Naturherdinfektion sei. Die Bildung von Foci ist ebenfalls von anderen zeckenübertragenen Pathogenen, z.B. FSME, bekannt (ZEMAN 1997, WALLENHAMMAR et al. 2020). Die Untersuchung von Zecken aus der Vegetation oder von Wildtieren im Rahmen von Q-Fieber-Ausbrüchen ungeklärter Ursache könnte daher zum Auffinden solcher Hot-Spots führen.

In dieser Dissertation wurde weiterhin die Vektorkompetenz von *I. ricinus* und *D. marginatus* unter Laborbedingungen untersucht. Dazu wurde ein artifizielles Fütterungssystem nach dem Vorbild von KRÖBER und GUERIN (2007) verwendet. Beide Zeckenspezies konnten erfolgreich im *in-vitro*-Fütterungssystem gefüttert werden. Sowohl adulte Vertreter beider Spezies als auch Nymphen der Spezies *I. ricinus* wurden gefüttert, wobei Letztere sich unter Laborbedingungen auch häuteten. Die erzielten Anteile vollgesogener Zecken an der Zahl eingesetzter Zecken (Vollsaugraten) waren vergleichbar mit denen anderer Studien mit dem verwendeten Fütterungsmodell (OLIVER et al. 2016, KRULL et al. 2017), die Häutungsrate war mit 92 % etwas höher (BÖHME 2016). Dies kann möglicherweise mit dem Fehlen antibiotischer Blutzusätze erklärt werden, welche im Rahmen der Versuche mit *C. burnetii* nicht eingesetzt werden konnten. Durch die Gefahr mikrobieller Kontamination des Bluts und der Membran und Kammer im Verlaufe der langwierigen Fütterung bei hoher Temperatur und Luftfeuchtigkeit, ist der Einsatz von Breitbandantibiotika und Antimykotika in der Zeckenfütterung häufig beschrieben (KUHNERT 1996, KRÖBER und GUERIN 2007, OLIVER et al. 2016). KRULL et al. (2017) stellten eine erhöhte Eimasse bei weiblichen Zecken fest, welche auf antibiotisch

behandeltem Blut gesaugt haben. Mehrere Studien wiesen jedoch nach, dass die antibiotische Behandlung durch ihre Wirkung auf das Mikrobiom einen negativen Einfluss auf die Fertilität und Weiterentwicklungsfähigkeit von Zecken hat (GUIZZO et al. 2017, LI et al. 2018a, BENOYSEF et al. 2020).

Im Vergleich der beiden verwendeten Spezies im artifiziellen Fütterungssystem stellen sich *D. marginatus* mit einer niedrigeren Fixations- und Vollsaugrate als schwieriger zu füttern dar. In der Fütterung der *D. marginatus* wurde in allen Versuchen eine Vollsaugrate von nur 29 % erreicht. In der Literatur wurden in Versuchen mit eng verwandten *D. reticulatus* mittels konventionellem und semi-automatisiertem Fütterungssystem unter verschiedenen Bedingungen Vollsaugraten zwischen 17 % und 49,6 % erreicht (KRULL et al. 2017, BÖHME et al. 2018). KRULL et al. (2017) untersuchten eine Verbesserung der Fütterung durch die Änderung verschiedener Umweltfaktoren. Dabei führte beispielsweise eine auf 5 % gesteigerte CO<sub>2</sub>-Konzentration zu einer signifikanten Erhöhung der Vollsaugrate. Auch eine erhöhte Glukosekonzentration von 4 g/l im Blut erzeugte einen positiven, wenn auch nicht signifikanten, Effekt. Eine Ursache für die niedrigen Fixierungsraten von *Dermacentor* spp. könnte in den deutlich kürzeren Mundwerkzeugen im Vergleich zu *I. ricinus* liegen. Allerdings wurde auch in den Vorversuchen zu den im Rahmen der Veröffentlichung durchgeführten Experimente unter Verwendung von dünneren Membranen, wie sie auch zur Nymphenfütterung eingesetzt werden, keine Steigerung erzielt.

Weibliche *I. ricinus*, welche mit *C. burnetii*-haltigem Blut gefüttert wurden, nahmen den Erreger aus dem Blut auf und waren während der Fütterung sowie bis zu sieben Wochen danach positiv für *C. burnetii*-DNA. Dabei unterschied sich die Höhe der Bakterienlast pro Milligramm Zecke zwischen den verschiedenen Zeitpunkten kaum. Das weist darauf hin, dass nach der Fütterung der adulten Weibchen mit *C. burnetii* keine starke Replikation des Erregers in der Zecke stattfand. KORDOVA und REHACEK (1959) wiesen hingegen sowohl *I. ricinus* als auch in *D. marginatus* eine mögliche Eignung zur Replikation von *C. burnetii* nach. Hierbei fand die Infektion der Zecken jedoch durch parenterale Injektion statt. Zwischen den Fütterungen auf Blut mit und ohne *C. burnetii* wurden keine signifikanten Unterschiede in der Zeckenfütterung nachgewiesen. Während bei OLIVER et al. (2016) ebenfalls kein Unterschied in der Fixierungs- und Vollsaugrate der Nymphen zwischen nativem und infiziertem Blut bestand, konnten LIU et al. (2014) eine Reduktion von Vollsaugrate und -gewicht bei *I. ricinus* feststellen, die an Blut saugten, welches zuvor mit *Bartonella henselae* versetzt worden war.

Sowohl *I. ricinus* als auch *D. marginatus* schieden in allen Versuchen *C. burnetii*-DNA mit dem Kot aus. Dies bestätigt historische Versuche, in denen Zeckenkot sich als infektiös für Meerschweinchen darstellte (SMITH 1941). Allerdings wurden in Veröffentlichungen dieser Zeit Methoden häufig nicht detailliert dargestellt, was die Bewertung der Aussagekraft erschwert. Auch SCHLIESSER (1991) berichtete von einer Ausscheidung und hohen Tenazität von *C. burnetii* mit dem Zeckenkot. In der hier vorliegenden Studie wurde ein Ausscheidungsverlauf unter kontrollierten artifiziellen Bedingungen dargestellt. Dass in allen Versuchen, bei denen Zecken mit Erregerkonzentrationen von  $10^5$  und  $10^6$  GE/ml gefüttert wurden, eine erhöhte Ausscheidung nach 10 Tagen der Fütterung auftrat, stützt die Hypothese, dass sich *C. burnetii* in den Mitteldarmzellen der Zecke vermehrt haben könnte. Durch eine 36-stündige Fütterung mit infektiösem Blut zu Beginn des Versuchs und die anschließende Fütterung auf sterilem Blut wurde in weiteren Versuchen eine Kontamination des Inneren der Kammer mit *C. burnetii* ausgeschlossen. Diese Versuche zeigten außerdem, dass eine kurze Bakteriämie ausreichend sein könnte, damit Zecken *C. burnetii* in hohem Maße ausscheiden. Eine Infektion mit  $10^4$  GE/ml Blut erwies sich als nicht ausreichend für die Infektion der Zecken. Durch Sektion und Färbung nach Giménez, welche jedoch nach heutigen Standards als unspezifisch in Zecken bewertet werden muss, wurden schon bei ŽUPANČIČOVÀ-MAJERSKA et al. (1972) verstärkt Coxiellen im Mitteldarm nachgewiesen. Dass Zecken, im Gegensatz zu anderen Arthropoden, intrazellulär in sauren Kompartimenten verdauen, spricht weiterhin für eine mögliche Vermehrung innerhalb der Mitteldarmzellen (SOJKA et al. 2013). Die erfolgreiche Isolierung der *C. burnetii* aus dem ausgeschiedenen Zeckenkot in der Zellkultur zeigt, dass der Kot auch nach Filtration durch  $0,45\ \mu\text{m}$ -große Filter *C. burnetii* in für die Infektion der Zellkultur ausreichenden Mengen enthält. Auch bei der Anzucht der Erreger aus Zeckenkot nach 12 Monaten Lagerung bei  $4\text{-}7\ \text{°C}$  konnten CCV in Zellkultur in Mausfibroblasten festgestellt werden (eigene, unveröffentlichte Daten). Dies unterstützt die Studie von SMITH (1941), bei welcher auch nach 65 Tagen Meerschweinchen mit Zeckenkot infiziert werden konnten. Die hohe Umweltresistenz der Erreger begünstigt die lange Infektiosität von *C. burnetii* im Zeckenkot. Eintrockneter Zeckenkot kann Stäube verursachen, welche zur Infektion führen könnten. Die Ergebnisse machen deutlich, dass insbesondere in positiven Herden eine Gefahr von infizierten Zecken ausgehen könnte, z.B. durch anhaftenden Zeckenkot im Vlies von Schafen. Dieser kann durch die Schur freigesetzt werden und könnte möglicherweise anschließend zur Infektion umstehender Personen durch Inhalation führen. SCHULZ et al. (2005) haben in der

Umgebung einer Schur einer seropositiven Schafherde *C. burnetii*-DNA in Staubproben identifiziert; allerdings ist dabei nicht geklärt, auf welchem Wege die Erreger ausgeschieden wurden und ob es sich um infektiöse Erreger handelte.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte weiterhin eine transstadiale Übertragung von *C. burnetii* von Nymphen auf das adulte Stadium von *I. ricinus* nachgewiesen werden sowie eine sich anschließende erneute Ausscheidung von *C. burnetii* über den Zeckenkot. Der Ausscheidungsverlauf stellte sich hierbei in der Form dar, dass schon zu Beginn der Fütterung über  $10^5$  GE *C. burnetii*/mg Zeckenkot ausgeschieden wurde und diese Erregerkonzentration während der Fütterung geringfügig anstieg. Diese Steigerung könnte mit der höheren Konzentrierung des Kots gegen Ende der Fütterung zusammenhängen. Die transstadiale Übertragungsrates betrug bei diesem Versuch 25 %. ŠIROKÝ et al. (2010) konnten in Versuchen mit *Hyalomma aegyptium* ebenfalls eine transstadiale Übertragung mit einer Rate von 28,9 % von Nymphen zu Adulten nachweisen. Dies stimmt mit den in dieser Studie nachgewiesenen Daten überein. Weiterhin wurden in der genannten Studie gesunde Meerschweinchen durch *C. burnetii*-positive Nymphen infiziert, wodurch eine horizontale Übertragung nachgewiesen wurde. Bei der Verwendung von Tieren kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Infektion des Tieres durch Inhalation des Zeckenkots stattfand. Auch in einer Studie von GONZÁLEZ et al. (2020) waren über ein Drittel der von Tieren entfernten *Hyalomma lusitanicum* Nymphen mit unklarem Infektionsstatus auch nach der Häutung positiv für *C. burnetii* und injizierten den Erreger in das Blut eines artifiziellen Fütterungssystems. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie erfolgte dort kein Nachweis von *C. burnetii* im Zeckenkot. Obwohl die Übertragungsrates in der hier durchgeführten Studie in Einklang mit Daten aus der Literatur über andere Zeckenspezies stehen, herrschen demnach unterschiedliche Angaben über den sich anschließenden Übertragungsweg. Dabei kann sich jedoch die Vektorkompetenz und der Übertragungsweg zwischen den Zeckenspezies unterscheiden. Das *in-vitro*-Fütterungssystem ist hier im Vorteil zur herkömmlichen Fütterung auf Versuchstieren. Mittels dieses Systems kann unter kontrollierten Bedingungen eine Ausscheidung mit dem Speichel und mit dem Kot unterschieden werden, während bei einer Infektion eines Versuchstieres der ursächliche Übertragungsweg nicht mit Sicherheit nachverfolgbar ist.

Der Gemeine Holzbock ist der Hauptvektor zeckenübertragener Erkrankungen in Mitteleuropa. In europäischen Studien wurde im Durchschnitt in 0,4 % der getesteten *I. ricinus* *C. burnetii* nachgewiesen. Eine Isolation von *C. burnetii* aus *I. ricinus*, jedoch ohne molekulardiagnostische Bestätigung, ist in Österreich durch KAASERER (1994) gelungen. Allerdings spricht die

allgemein niedrige Prävalenz des Erregers gegen eine bedeutende Rolle der Spezies bei der Übertragung von Q-Fieber in Deutschland (HARTELT et al. 2008, PLUTA et al. 2010, HILDEBRANDT et al. 2011).

Durch die niedrige Vollaugrate war es nicht möglich, auch *D. marginatus* mit verschiedenen Konzentrationen von *C. burnetii* zu füttern. Dennoch stellte sich in den durchgeführten Versuchen bezüglich der Ausscheidung der Erreger ein mit *I. ricinus* vergleichbares Bild dar. LIEBISCH (1977) erklärte *D. marginatus* zu einem wichtigen Vektor in Deutschland – zum einen, da er in diesen Zeckenspezies *C. burnetii* mittels parenteraler Infektion von Meerschweinchen detektiert hat, zum anderen, da die Verbreitung von *D. marginatus* mit vermehrt gemeldeten Q-Fieber-Fällen in Deutschland starke Überschneidungen aufweist. STING et al. (2004) wiesen in einer von 1066 in Baden-Württemberg gesammelten Zecken der Gattung *Dermacentor* *C. burnetii* nach. In den ausgewerteten europäischen Prävalenzstudien wurde ebenfalls keine erhöhte Prävalenz in *Dermacentor* spp. festgestellt. Auch in der hier durchgeführten Studie ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Ausscheidung von *C. burnetii* dieser Spezies zu der von *I. ricinus* nachweisen. Jedoch muss bedacht werden, dass *D. marginatus* aufgrund der Größe höhere Mengen an Zeckenkot ausscheidet, wodurch sich eine erhöhte Gesamterregerlast ergeben kann. Es wurden keine Versuche zur transstadialen Übertragung von *D. marginatus* durchgeführt. Juvenile Stadien von *Dermacentor* spp. konnten in der Vergangenheit trotz des Einsatzes verschiedener Stimuli nicht erfolgreich gefüttert werden (KRULL et al. 2017, BÖHME 2016). Dies kann an der Kürze der Mundwerkzeuge liegen oder auch an der endophilen Lebensweise. Für die Klärung der Vektorkompetenz der Spezies ist es daher notwendig, alternative Fütterungsmethoden zu entwickeln und Fütterungsstimuli zu erforschen, welche die Fixation der juvenilen Lebensstadien fördert. TRENTELMAN et al. (2017) haben bereits ein auf 24-Well-Platten basierendes Membransystem für juvenile *Rhipicephalus australis* entwickelt, welche ebenfalls über kurze Mundwerkzeuge verfügen. Ähnliche Systeme könnten daher möglicherweise auch für *Dermacentor* spp. geeignet sein.

In den Versuchen wurde gezeigt, dass heimische Zecken, insbesondere *I. ricinus*, unter Laborbedingungen eine Vektorkompetenz besitzen. Mit dem *in-vitro*-Fütterungssystem können im Sinne der „3R-Prinzipien“ – Replace, Reduce, Refine – Tierversuche eingespart werden und insbesondere in der Arbeit mit S3-Erregern kann Aufwand verringert werden. KRÖBER und GUERIN (2007) stellten dar, dass diese Fütterungsmethode ressourcenschonend ist und sich auch für die Testung akarizider Substanzen eignet. Bereits OLIVER et al. (2016) führten mit *Ixodes scapularis* Versuche im membranbasierten Fütterungssystem durch, in denen Nymphen

mit *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Rickettsia monacensis* oder einem *Ehrlichia muris*-ähnlichem Pathogen infiziert und auf transstadiale Übertragung untersucht wurden. Dabei konnte eine transstadiale Übertragung aller Pathogene nachgewiesen werden, allerdings in unterschiedlichem Maße. Als möglicher Einflussfaktor wurde hierbei die Zugabe von Bakterien zum Futterblut innerhalb ihrer zur Anzucht verwendeten Zellen diskutiert. Im vorliegenden Versuch wurden die verwendeten *C. burnetii* vor der Fütterung aus den zur Anzucht verwendeten L929-Zellen aufgereinigt und ohne Wirtszelle verfüttert, wodurch dieser Einflussfaktor als gering anzusehen ist.

Die *in-vitro*-Fütterung stellt ein Modell für die natürliche Infektion von Zecken dar. Durch die artifizielle Infektion der Zecken mit Pathogenen kann eine prinzipielle Vektorkompetenz im Sinne der transstadialen Übertragung zur nächsten Entwicklungsstufe sowie der transovarialen Übertragung in die nächste Generation untersucht werden. Dabei erreicht das Modell seine Grenzen darin, dass verschiedene Faktoren der Infektion des Wirts, wie Höhe und Dauer der Bakteriämie, artifiziell erreicht werden müssen. In der Studie wurde in *I. ricinus* eine Ausscheidung von Bakterien ab einer Infektionskonzentration von  $10^5$  GE/ml gezeigt. In Versuchen, in denen Zecken nur zu Beginn der Fütterung auf Coxiellen-haltigem Blut gefüttert wurden, war eine erneute Ausscheidung im Kot nach einer Woche erst ab einer Konzentration von  $10^6$  GE/ml sichtbar. Bei akut infizierten Menschen können *C. burnetii*-Konzentrationen über  $10^5$  GE/ml Blut nachgewiesen werden, allerdings liegen keine Aussagen zur Dauer einer solchen Bakteriämie vor (WIELDERS et al. 2013). Eine Bakteriämie dieser Höhe kann nach Aussage der Literatur ebenfalls in Mäusen erreicht werden; in Versuchen mit experimentell infizierten Ziegen wurden hingegen keine *C. burnetii* im Blut nachgewiesen (MELENOTTE et al. 2016, ROEST et al. 2012, ROEST et al. 2020). In den Versuchen zur transstadialen Übertragung wurden die Nymphen über den gesamten Fütterungszeitraum mit einer Konzentration von  $10^6$  GE/ml Blut gefüttert. Es gibt kaum Daten über die Dauer der Bakteriämie bei Coxiellose im Wirtstier, doch Modellstudien legen nahe, dass die Bakteriämie über diesen Zeitraum nicht in der Höhe aufrechterhalten wird. GONZÁLEZ et al. (2020) konnten im gleichen Fütterungsmodell eine horizontale Übertragung von *C. burnetii* durch natürlich infizierte *Hyalomma lusitanicum* mit unbekanntem Infektionsstatus nachweisen. In der vorliegenden Studie konnte dies bei transstadial infizierten Adulten jedoch nicht nachgewiesen werden, allerdings war die Sensitivität der verwendeten Methoden nicht ausreichend, um eventuell vorhandene kleinere Mengen an Coxiellen im Blut nachzuweisen. Die verwendete qPCR hatte ein Detektionslimit von 10 Kopien, zudem tritt durch die Menge des Blutes (1 ml), in das die Zecken potenziell Erreger injizieren, ein Verdünnungseffekt ein (KLEE et al. 2006). Da jedoch bis zu 10 Bakterien für die

Infektion eines Menschen ausreichen, ist eine Infektion durch den Stich einer Zecke nicht auszuschließen, scheint jedoch ein untergeordneter Übertragungsweg zu sein. Weitere Experimente, möglicherweise mit kleineren Blutmengen, wie sie in einer Fütterung über Kapillaren verwendet werden, oder die Verwendung sensitiverer Methoden sind notwendig, um die Übertragung von *C. burnetii* durch den Zeckenstich der *I. ricinus* ausschließen zu können. Weiterhin wurde in den Versuchen mit dem attenuierten Stamm Nine Mile Phase II gearbeitet. Diesem fehlt durch das unvollständige LPS ein Virulenzfaktor. In Zellkultur stellt sich dieser dennoch als infektiös dar, wodurch er als Modell in Laborversuchen überwiegend eingesetzt wird. Dennoch könnten Versuche mit virulenten Phase I-Erregern Aufschluss über mögliche Unterschiede im Verhalten einzelner Isolate in der Zecke geben.

Für beide in Deutschland beheimatete Zeckenspezies konnte im Rahmen der Experimente unter Laborbedingungen eine mögliche Beteiligung bei der Verbreitung von *C. burnetii* nachgewiesen werden. Die Zeckenpopulation ist ein sich stetig änderndes System und verstärkter Reise- und Frachtverkehr sowie die klimatischen Veränderungen begünstigen die Verbreitung dieser Vektoren. Insbesondere in den letzten Jahren breiteten sich die beiden heimischen Buntzecken-Spezies weiterhin aus (DREHMANN et al. 2020). *Hyalomma marginatum* und *Hyalomma rufipes*, welche ursprünglich in Nordafrika und dem Balkan beheimatet sind, wurden kürzlich vermehrt in Deutschland nachgewiesen und konnten wohl auch überwintern (CHITIMIA-DOBLER et al. 2019). Mit der Ausbreitung der Zecken nimmt auch das Risiko zeckenübertragener Pathogene weiterhin zu. Die Rolle von Zecken in der Übertragung von Erkrankungen wie Q-Fieber muss daher weiterhin kritisch beobachtet werden.

## 5 Zusammenfassung

Sophia Körner

### **Untersuchungen zur Vektorkompetenz von Zecken für *Coxiella burnetii***

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im März 2021

75 Seiten, 4 Abbildungen, 206 Literaturangaben, 2 Publikationen, 1 Anhang

Schlüsselwörter: Q-Fieber, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *in-vitro*-Fütterung, real-time PCR

**Einleitung:** *Coxiella burnetii* ist ein gramnegatives und obligat intrazelluläres Bakterium und Erreger der meldepflichtigen Zoonose Q-Fieber. Den Hauptübertragungsweg stellt die Inhalation infizierter Stäube dar, aber auch Zecken werden seit der Isolation des Pathogens aus der Spezies *Dermacentor andersonii* als Vektoren diskutiert. Es liegen jedoch keine gesicherten Berichte über Infektionen des Menschen durch Zecken oder eine Beteiligung von Vektoren bei Q-Fieber-Ausbrüchen vor. Zudem steht durch die genetische Nähe zu überwiegend apathogenen Endosymbionten die Spezifität molekularer Untersuchungsmethoden in Frage, wodurch die Relevanz von Zecken in der Übertragung von Q-Fieber in der Literatur kontrovers diskutiert wird.

**Ziele der Untersuchung:** Es sollten mithilfe einer systematischen Literaturanalyse die Daten zur Prävalenz von *C. burnetii* in Zecken in Europa dargelegt werden. Zudem sollte mittels eines *in-vitro*-Fütterungssystems untersucht werden, inwieweit die heimischen Spezies *Ixodes ricinus* und *Dermacentor marginatus* den Erreger aus dem Blut aufnehmen und ausscheiden, sowie ob das Bakterium transstadial in *I. ricinus* übertragen wird, wodurch Aussagen über die Vektorkompetenz dieser Arten möglich sind.

**Tiere, Material und Methoden:** Im experimentellen Ansatz wurde die Infektion der Zecken in einem Silikonmembran-basierten Fütterungssystem mit heparinisiertem Rinderblut vorgenommen. Die Gruppengrößen betragen 7-9 Weibchen mit fünf Männchen oder 50-60 Nymphen. Es wurden verschiedene Konzentrationen *C. burnetii* Nine Mile RSA439 Phase II eingesetzt:  $10^4$  (zwei Gruppen adulte *I. ricinus*),  $10^5$  (zwei Gruppen adulte *I. ricinus*) und  $10^6$  (fünf Gruppen adulte *I. ricinus*, vier Gruppen adulte *D. marginatus*, drei Gruppen *I. ricinus* Nymphen) Genomäquivalente (GE)/ml Blut sowie insgesamt sieben Negativkontrollgruppen. Zudem wurden vier Gruppen adulte *I. ricinus* für 36 Stunden zu Beginn der Fütterung mit  $10^6$  GE

*C. burnetii*/ml infiziert und anschließend mit sterilem Blut gefüttert. Täglich wurde Zeckenkot entfernt, zudem wurden adulte *I. ricinus* zu unterschiedlichen Zeitpunkten während oder nach der Fütterung entnommen. Die Proben wurden nach DNA-Extraktion mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) auf das *C. burnetii*-Gen *icd* untersucht. Ein Teil (n = 46) der infizierten Nymphen wurde vor bzw. nach der Häutung mittels qPCR untersucht. Ein anderer Teil (acht Weibchen in zwei Gruppen) wurde nach der Häutung erneut auf sterilem Blut gefüttert. Dabei wurden Kot sowie Blut getestet. Weiterhin fand in L929-Zellen und axenischem Medium eine Anzucht von *C. burnetii* aus einem Filtrat des Zeckenkots sowie aus dem Filtrat eines qPCR-positiven Weibchens statt, welches sich von einer zuvor infizierten Nymphe gehäutet hatte. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS V 22.0, wobei je nach Voraussetzung der t-Test, der Mann-Whitney-U-Test sowie der Chi<sup>2</sup>-Test nach Pearson verwendet wurden. Das Signifikanzniveau wurde jeweils auf  $p < 0,05$  festgelegt.

**Ergebnisse:** Im Fütterungssystem haben 49 % der adulten *I. ricinus* und 29 % der *D. marginatus* vollständig gesaugt. Die Häutungsrate der *I. ricinus* Nymphen betrug 92 %. *I. ricinus*-Weibchen nahmen den Erreger auf, welcher innerhalb von sieben Wochen in einer Konzentration von ca.  $10^3$  GE/mg in den Zecken nachweisbar war. Eine Ausscheidung von infektiösen *C. burnetii* mit dem Kot wurde bei adulten Zecken ab einer Konzentration von  $10^5$  GE/ml im verfütterten Blut festgestellt. Dabei erfolgte in allen Versuchen mit beiden Zeckenspezies eine signifikant höhere Ausscheidung von *C. burnetii* an den Tagen 10-13, welche bis zu  $10^5$  GE/mg erreichte. Es wurde eine transstadiale Übertragung bei *I. ricinus* mit einer Rate von 25 % nachgewiesen. Infizierte Nymphen, die nach der Häutung steriles Blut bekamen, schieden ebenfalls *C. burnetii* im Kot aus; im Blut wurde hingegen keine DNA von *C. burnetii* nachgewiesen.

**Schlussfolgerungen:** Das genutzte Fütterungssystem eignet sich für die Untersuchung der Vektorkompetenz von Zecken. Beide Zeckenspezies sind in der Lage, infektiösen Zeckenkot auszuschcheiden, wodurch eine Gefahr einer möglichen aerogenen Übertragung entsteht. Dabei muss jedoch eine hohe Erregerkonzentration im Blut des Wirts erreicht werden. Es wurde eine transstadiale Übertragung von *C. burnetii* in *I. ricinus* von Nymphen zu Adulten und damit die Möglichkeit der Bildung eines Reservoirs nachgewiesen. Die Ergebnisse legen eine Vermehrung von *C. burnetii* im Mitteldarm der Zecken nahe. Dadurch konnten historische Aussagen aus der Literatur über andere Zeckenspezies zur Ausscheidung von *C. burnetii* mittels Zeckenkot bestätigt werden. In der Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass heimische Zecken unter Laborbedingungen zur Verbreitung von Q-Fieber beitragen können. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die tatsächliche Bedeutung der Vektorkompetenz von Zecken unter natürlichen Bedingungen abschätzen zu können.

## 6 Summary

Sophia Körner

### **Examination of the vector competence of ticks for *Coxiella burnetii***

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

Submitted in March 2021

75 pages, 4 figures, 206 references, 2 publications, 1 appendix

Keywords: Q fever, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *in vitro* feeding, real-time PCR

**Introduction:** *Coxiella burnetii* is a gram-negative obligate intracellular bacterium and causes the notifiable zoonosis Q fever. The main transmission route is via inhalation of contaminated dusts. In addition, ticks are discussed vectors since the first isolation of the agent in a *Dermacentor andersonii*. However, there are no reliable data on human infection by ticks and an involvement of vectors in Q fever outbreaks could not be proven. Furthermore, in consideration of the close genetic relationship to mainly apathogenic endosymbionts, which compromises the specificity of molecular methods, the significance of ticks in Q fever transmission is controversially discussed.

**Objective:** Data regarding prevalence of *C. burnetii* in ticks in Europe should be analyzed by systematic literature research. Furthermore, it was aimed to examine the uptake and excretion of the agent in the native tick species *Ixodes ricinus* and *Dermacentor marginatus* as well as the transstadial transmission in an *in vitro* feeding system in order to assess the vector competence of these species.

**Animals, Material and Methods:** Ticks were infected in a silicone membrane-based feeding system in the experimental approach. One group consisted of 7-9 females with five males or 50-60 nymphs. The used concentrations of *C. burnetii* Nine Mile RSA 439 (Phase II) were  $10^4$  (two groups of adult *I. ricinus*),  $10^5$  (two groups of adults *I. ricinus*) and  $10^6$  (five groups of adult *I. ricinus*, four groups of adult *D. marginatus*, three groups of *I. ricinus* nymphs) genome equivalents (GE)/ml blood. Furthermore, four groups of adult *I. ricinus* were infected with  $10^6$  GE *C. burnetii*/ml for the first 36 hours of feeding and were fed until repletion with sterile blood. Tick feces was collected daily and adult *I. ricinus* were removed at different points in time during and after feeding. Samples were analyzed after DNA extraction using quantitative real-time PCR (qPCR) targeting the *icd* gen. Part of the infected nymphs (n = 46) were examined by qPCR before and after molting, another part (eight females in two groups) was fed again

## Summary

on sterile blood after molting in order to test feces as well as blood. Furthermore, *C. burnetii* was cultivated in L929 cells and axenic medium from a filtrate of tick feces and from a filtrate of a qPCR-positive female, which molted from an infected nymph. The statistical analysis was done by SPSS V 22.0, using t-test, Mann-Whitney *U* test as well as Pearson's Chi<sup>2</sup> test, depending on the data. The significance level was set to  $p < 0,05$ .

**Results:** In the feeding system, 49% of adult *I. ricinus* and 29% of *D. marginatus* fed until repletion. The molting rate of *I. ricinus* nymphs was 92%. An uptake of *C. burnetii* by female *I. ricinus* was determined and the concentration in the tick was stable at ca.  $10^3$  GE/mg tick. An excretion of viable *C. burnetii* with the feces was shown when ticks were fed on blood with a concentration of at least  $10^5$  GE/ml. A transstadial transmission from *I. ricinus* nymphs to adults occurred in 25% of ticks. Infected nymphs, which were fed on sterile blood after feeding, also excreted *C. burnetii* with their feces, whereas no DNA of *C. burnetii* was detected in the blood, on which the ticks fed.

**Conclusion:** The feeding system is applicable for the assessment of the vector competence of ticks. Both tick species are capable of excretion of infected feces, which causes a risk of a transmission via inhalation. However, a high bacteremic concentration in the blood of the host is needed. A transstadial transmission of *C. burnetii* in *I. ricinus* from nymphs to adults was demonstrated resulting in the possibility of the maintenance of a reservoir. The results suggest a replication of the pathogen in the tick's midgut. Historic assumptions of an excretion of *C. burnetii* by other tick species were confirmed. The study shows that native tick species are able to contribute to the spread of Q fever under laboratory conditions. Further studies are however needed to assess the actual significance of the vector competence of ticks in Q fever epidemiology under natural conditions.

**7 Literaturverzeichnis**

Abnave P, Muracciole X, Ghigo E. *Coxiella burnetii* lipopolysaccharide: What do we know? Int J Mol Sci. 2017;18:2509.

Alkishe AA, Peterson AT, Samy AM. Climate change influences on the potential geographic distribution of the disease vector tick *Ixodes ricinus*. PLoS One. 2017;12:e0189092.

Andersen SO, Roepstorff P. The extensible alloscutal cuticle of the tick, *Ixodes ricinus*. Insect Biochem Mol Biol. 2005;35:1181-8.

Angelakis E, Mediannikov O, Jos SL, Berenger JM, Parola P, Raoult D. *Candidatus* *Coxiella massiliensis* Infection. Emerg Infect Dis. 2016;22:285-8.

Angelakis E, Raoult D. Q Fever. Vet Microbiol. 2010;140:297-309.

Anon. Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz - IfSG) vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045), das zuletzt durch Artikel 2 des Gesetzes vom 18. November 2020 (BGBl. I S. 2397) geändert worden ist.

Anon. Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten (TKrMeldpflV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 11. Februar 2011 (BGBl. I S. 252), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 8. Juli 2020 (BGBl. I S. 1604) geändert worden ist.

Arricau-Bouvery N, Souriau A, Lechopier P, Rodolakis A. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. Vet Res. 2003;34:423-33.

Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A. Is Q fever an emerging or reemerging zoonosis? Vet Res. 2005;36,327–349.

Asghar N, Petersson M, Johansson M, Dinnetz P. Local landscape effects on population dynamics of *Ixodes ricinus*. Geospat Health. 2016;11:487.

Barlow J, Rauch B, Welcome F, Kim SG, Dubovi E, Schukken Y. Association between *Coxiella burnetii* shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle. Vet Res. 2008;39:23.

Bauer B, Wetzel H. A new membrane for feeding *Glossina morsitans* Westw. (Diptera, Glossinidae). Bull Entomol Res. 1976;64:563-5.

Ben-Yosef M, Rot A, Mahagna M, Kapri E, Behar A, Gottlieb Y. *Coxiella*-like endosymbiont of *Rhipicephalus sanguineus* is required for physiological processes during ontogeny. Front Microbiol. 2020;11:493.

- Blazejak K, Janecek E, Strube C. A 10-year surveillance of *Rickettsiales* (*Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum*) in the city of Hanover, Germany, reveals *Rickettsia* spp. as emerging pathogens in ticks. *Parasit Vectors*. 2017;10:588.
- Boden K, Brasche S, Straube E, Bischof W. Specific risk factors for contracting Q fever: lessons from the outbreak Jena. *Int J Hyg Environ Health*. 2014;217:110-5.
- Boden K, Wolf K, Hermann B, Frangoulidis D. First isolation of *Coxiella burnetii* from clinical material by cell-free medium (ACCM2). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34:1017-22.
- Boehnke D, Brugger K, Pfäffle M, Sebastian P, Norra S, Petney T, Oehme R, Littwin N, Lebl K, Raith J, Walter M, Gebhardt R, Rubel F. Estimating *Ixodes ricinus* densities on the landscape scale. *Int J Health Geogr*. 2015;14:23.
- Böhme B. *In-vitro*-Fütterung von *Dermacentor reticulatus* und *Ixodes ricinus* und Entwicklung eines teilautomatisierten Fütterungssystems für Schildzecken [Dissertation med. vet]. Freie Univ, Berlin; 2016.
- Böhme B, Krull C, Clausen PH, Nijhof AM. Evaluation of a semi-automated *in vitro* feeding system for *Dermacentor reticulatus* and *Ixodes ricinus* adults. *Parasitol Res*. 2018;117:565-570.
- Bonnet S, Jouglin M, Malandrin L, Becker C, Agoulon A, L'hostis M, Chauvin A. Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. *Parasitology*. 2007;134:197-207.
- Bonnet S, Liu XY. Laboratory artificial infection of hard ticks: a tool for the analysis of tick-borne pathogen transmission. *Acarologia*. 2012;52:453–64.
- Bonnet S, de la Fuente J, Nicollet P, Liu X, Madani N, Blanchard B, Maingourd C, Alongi A, Torina A, Fernández de Mera IG, Vicente J, George JC, Vayssier-Taussat M, Joncour G. Prevalence of tick-borne pathogens in adult *Dermacentor* spp. ticks from nine collection sites in France. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2013;13:226-36.
- Bonnet SI, Binetruy F, Hernández-Jarguín AM, Duron O. The Tick Microbiome: Why non-pathogenic microorganisms matter in tick biology and pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:236.
- Brennan RE, Samuel JE. Evaluation of *Coxiella burnetii* antibiotic susceptibilities by real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2003;41:1869-74.

- Brenner AE, Muñoz-Leal S, Sachan M, Labruna MB, Raghavan R. Ticks convert pathogenic *Coxiella* into endosymbionts. bioRxiv (Preprint) 2020;12.29.424491. (Zugriff: 26.01.2021)
- Broadwater AH, Sonenshine DE, Hynes WL, Ceraul S, De SA. Glass capillary tube feeding: a method for infecting nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with the lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. J Med Entomol. 2002;39:285-92.
- Burnet FM, Freeman M. Experimental studies on the virus of 'Q' fever. Med J Aust. 1937;2:299–305.
- Buyse M, Plantard O, McCoy KD, Duron O, Menard C. Tissue localization of *Coxiella*-like endosymbionts in three European tick species through fluorescence in situ hybridization. Ticks Tick Borne Dis. 2019;10:798-804.
- Cayol C, Koskela E, Mappes T, Siukkola A, Kallio ER. Temporal dynamics of the tick *Ixodes ricinus* in northern Europe: epidemiological implications. Parasit Vectors. 2017;10:166.
- Cerutti F, Modesto P, Rizzo F, Cravero A, Jurman I, Costa S, Giammarino M, Mandola ML, Gorla M, Radovic S, Cattonaro F, Acutis PL, Peletto S. The microbiota of hematophagous ectoparasites collected from migratory birds. PLoS One. 2018;13:e0202270.
- Chicana B, Couper LI, Kwan JY, Tahiraj E, Swei A. Comparative microbiome profiles of sympatric tick species from the Far-Western United States. Insects. 2019;10(10):353.
- Chisu V, Alberti A, Zobba R, Foxi C, Masala G. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Babesia* and *Theileria* spp. in ticks from domestic and wild hosts in Sardinia. Acta Trop. 2019;196:60-65.
- Chitimia-Dobler L, Schaper S, Rieß R, Bitterwolf K, Frangoulidis D, Bestehorn M, Springer A, Oehme R, Drehmann M, Lindau A, Mackenstedt U, Strube C, Dobler G. Imported *Hyalomma* ticks in Germany in 2018. Parasit Vectors. 2019;12:134.
- Coleman SA, Fischer ER, Howe D, Mead DJ, Heinzen RA. Temporal analysis of *Coxiella burnetii* morphological differentiation. J Bacteriol. 2004;186:7344-52.
- Couper L, Swei A. Tick microbiome characterization by Next-Generation 16S rRNA Amplicon Sequencing. J Vis Exp. 2018;138:58239.
- Cutler SJ, Bouzid M, Cutler RR. Q fever. J Infect. 2007;54:313-8.

- Darvishi MM, Youssefi MR, Changizi E, Shayan P, Lima RR, Rahimi MT. Biology of *Dermacentor marginatus* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Asian Pac J Trop Dis*. 2014;1:284-9.
- Dautel H, Knülle W. The supercooling ability of ticks (Acari, Ixodoidea). *J Comp Physiol B*. 1996;166:517-24.
- Dautel H. Zecken und Temperatur. In: Aspöck, Hrsg. *Krank durch Arthropoden - Denisia* 30; 2010. 149-69.
- Davis GE, Cox HR. A filter-passing infectious agent isolated from ticks. I. Isolation from *Dermacentor andersonii*, reactions with animals, and filtration experiments. *Publ Health Rep*. 1938;53:2259-76.
- de Biase D, Costagliola A, Del Piero F, Di Palo R, Coronati D, Galiero G, Uberti BD, Lucibelli MG, Fabbiano A, Davoust B, Raoult D, Paciello O. *Coxiella burnetii* in infertile dairy cattle with chronic endometritis. *Vet Pathol*. 2018;55:539-42.
- de Lange MMA, Scheepmaker A, van der Hoek W, Leclercq M, Schneeberger PM. Risk of chronic Q fever in patients with cardiac valvulopathy, seven years after a large epidemic in the Netherlands. *PLoS One*. 2019;14:e0221247.
- de Moura ST, da Fonseca AH, Fernandes CG, Butler JF. Artificial feeding of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) through silicone membrane. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997;92:545-8.
- Derrick EH. 'Q' fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. *Med J Aust*. 1937;2:281-99.
- Dörr B, Gothe R. Cold-hardiness of *Dermacentor marginatus* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol*. 2001;25:151-69.
- Drehmann M, Springer A, Lindau A, Facht K, Mai S, Thoma D, Schneider CR, Chitimia-Dobler L, Bröker M, Dobler G, Mackenstedt U, Strube C. The spatial distribution of *Dermacentor* ticks (Ixodidae) in Germany-evidence of a continuing spread of *Dermacentor reticulatus*. *Front Vet Sci*. 2020;7:578220.
- Duron O, Hurst GD. Arthropods and inherited bacteria: from counting the symbionts to understanding how symbionts count. *BMC Biol*. 2013;11:45.

Duron O. The IS1111 insertion sequence used for detection of *Coxiella burnetii* is widespread in *Coxiella*-like endosymbionts of ticks. FEMS Microbiol Lett. 2015;362:fnv132.

Duron O, Noël V, McCoy KD, Bonazzi M, Sidi-Boumedine K, Morel O, Vavre F, Zenner L, Jourdain E, Durand P, Arnathau C, Renaud F, Trape JF, Biguezoton AS, Cremaschi J, Dietrich M, Léger E, Appelgren A, Dupraz M, Gómez-Díaz E, Diatta G, Dayo GK, Adakal H, Zoungrana S, Vial L, Chevillon C. The recent evolution of a maternally-inherited endosymbiont of ticks led to the emergence of the Q Fever pathogen, *Coxiella burnetii*. PLoS Pathog. 2015;11:e1004892. [DURON et al. 2015a]

Duron O, Sidi-Boumedine K, Rousset E, Moutailler S, Jourdain E. The importance of ticks in Q Fever transmission: What has (and has not) been demonstrated? Trends Parasitol 2015;31:536-52. [DURON et al. 2015b]

Duron O, Binetruy F, Noël V, Cremaschi J, McCoy KD, Arnathau C, Plantard O, Goolsby J, Pérez de León AA, Heylen DJA, Van Oosten AR, Gottlieb Y, Baneth G, Guglielmo AA, Estrada-Peña A, Opara MN, Zenner L, Vavre F, Chevillon C. Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. Mol Ecol. 2017;26:2905-21.

Dwuźnik 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.

Eisen L. Vector competence studies with hard ticks and *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes: A review. Ticks Tick Borne Dis. 2020;11:101359.

Estrada-Peña A. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. Rev Sci Tech. 2015;34:53-65.

Estrada-Peña A, Gray JS, Kahl O, Lane RS, Nijhof AM. Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens--methodological principles and caveats. Front Cell Infect Microbiol. 2013;3:29.

Falke, H. Beiträge zur Lebensgeschichte und zur postembryonalen Entwicklung von *Ixodes ricinus* L. Zeitschrift Für Morphologie Und Ökologie Der Tiere. 1931;21:567-607.

Flanders AJ, Rosenberg JF, Bercier M, Leissinger MK, Black LJ, Giglio RF, Craft SLM, Zoll WM, Childress AL, Wellehan JFX. Antemortem diagnosis of coxiellosis in a Blue and Gold Macaw (*Ara ararauna*). J Avian Med Surg. 2017;31:364-72.

- Foelix RF, Axtell RC. Ultrastructure of Haller's organ in the tick *Amblyomma americanum* (L.). *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1972;124:275-92.
- Földvári G, Široký P, Szekeres S, Majoros G, Sprong H. *Dermacentor reticulatus*: a vector on the rise. *Parasit Vectors.* 2016;9:314.
- Fourie JJ, Stanneck D, Luus HG, Beugnet F, Wijnveld M, Jongejan F. Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. *Vet Parasitol.* 2013;197:595-603.
- Franta Z, Frantová H, Konvičková J, Horn M, Sojka D, Mareš M, Kopáček P. Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Parasit Vectors.* 2010;3:119.
- Gache K, Rousset E, Perrin JB, DE Cremoux R, Hosteing S, Jourdain E, Guatteo R, Nicollet P, Touratier A, Calavas D, Sala C. Estimation of the frequency of Q fever in sheep, goat and cattle herds in France: results of a 3-year study of the seroprevalence of Q fever and excretion level of *Coxiella burnetii* in abortive episodes. *Epidemiol Infect.* 2017;145:3131-42.
- Gale P, Kelly L, Mearns R, Duggan J, Snary EL. Q fever through consumption of unpasteurised milk and milk products - a risk profile and exposure assessment. *J Appl Microbiol.* 2015;118:1083-95.
- Gardiner W, Gettinby G. A weather-based prediction model for the life-cycle of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. *Vet Parasitol.* 1983;13:77-84.
- Giemenéz DF. Staining *Rickettsiae* in yolk-sac cultures. *Stain Technol.* 1964;39:135-40.
- González J, González MG, Valcárcel F, Sánchez M, Martín-Hernández R, Tercero JM, Olmeda AS. Prevalence of *Coxiella burnetii* (Legionellales: Coxiellaceae) Infection among wildlife species and the tick *Hyalomma lusitanicum* (Acari: Ixodidae) in a Meso-Mediterranean ecosystem. *J Med Entomol.* 2020;57:551-6.
- Graham JG, MacDonald LJ, Hussain SK, Sharma UM, Kurten RC, Voth DE. Virulent *Coxiella burnetii* pathotypes productively infect primary human alveolar macrophages. *Cell Microbiol.* 2013;15:1012–25.
- Gray JS, Kahl O, Lane RS, Levin ML, Tsao JI. Diapause in ticks of the medically important *Ixodes ricinus* species complex. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7:992-1003.

- Greenslade E, Beasley R, Jennings L, Woodward A, Weinstein P. Has *Coxiella burnetii* (Q fever) been introduced into New Zealand? *Emerg Infect Dis.* 2003;9:138-40.
- Groten T, Kuenzer K, Moog U, Hermann B, Maier K, Boden K. Who is at risk of occupational Q fever: new insights from a multi-profession cross-sectional study. *BMJ Open.* 2020;10:e030088.
- Guizzo MG, Parizi LF, Nunes RD, Schama R, Albano RM, Tirloni L, Oldiges DP, Vieira RP, Oliveira WHC, Leite MS, Gonzales SA, Farber M, Martins O, Vaz IDS Jr, Oliveira PL. A *Coxiella* mutualist symbiont is essential to the development of *Rhipicephalus microplus*. *Sci Rep.* 2017;7:17554.
- Gyuranecz M, Dénes B, Hornok S, Kovács P, Horváth G, Jurkovich V, Varga T, Hajtós I, Szabó R, Magyar T, Vass N, Hofmann-Lehmann R, Erdélyi K, Bhide M, Dán Á. Prevalence of *Coxiella burnetii* in Hungary: screening of dairy cows, sheep, commercial milk samples, and ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012;12:650-3.
- Hackstadt T, Peacock MG, Hitchcock PJ, Cole RL. Lipopolysaccharide variation in *Coxiella burnetii*: intrastain heterogeneity in structure and antigenicity. *Infect Immun.* 1985;48:359-65.
- Hackstadt T, Williams JC. Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78:3240-4.
- Hajdušek O, Síma R, Ayllón N, Jalovecká M, Perner J, de la Fuente J, Kopáček P. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:26.
- Hartelt K, Pluta S, Oehme R, Kimmig P. Spread of ticks and tick-borne diseases in Germany due to global warming. *Parasitol Res.* 2008;103:109-16.
- Hechemy KE, McKee M, Marko M, Samsonoff WA, Roman M, Baca O. Three-dimensional reconstruction of *Coxiella burnetii*-infected L929 cells by high-voltage electron microscopy. *Infect Immun.* 1993;61:4485-8.
- Hefnawy, T. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Water loss from the spiracles of *Hyalomma* (H.) *dromedarii* Koch (Ixodidae) and *Ornithodoros* (O.) *savignyi* (Audouin) (Argasidae). *J Parasitol.* 1970;1:362-6.
- Hellenbrand W, Breuer T, Petersen L. Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:789-96.

- Hildebrandt A, Straube E, Neubauer H, Schmoock G. *Coxiella burnetii* and coinfections in *Ixodes ricinus* ticks in Central Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011;11:1205-7.
- Honzáková E, Olejníček J, Černý V, Daniel M, Dusbábek F. Relationship between number of eggs deposited and body weight of engorged *Ixodes ricinus* female. *Folia Parasitol.* 1975;22:37-42.
- Horn M, Nussbaumerová M, Sanda M, Kovárová Z, Srba J, Franta Z, Sojka D, Bogyo M, Caffrey CR, Kopáček P, Mares M. Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: mapping a multiprotease pathway by functional proteomics. *Chem Biol.* 2009;16:1053-63.
- Huebner RJ, Jellison WL. Q fever studies in Southern California; effects of pasteurization on survival of *C. burnetii* in naturally infected milk. *Public Health Rep.* 1949;64(16):499–511.
- Islam A, Lockhart M, Stenos J, Graves S. The attenuated Nine mile phase II clone 4/RSA439 strain of *Coxiella burnetii* is highly virulent for severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;89:800-3.
- Jang YR, Shin Y, Jin CE, Koo B, Park SY, Kim MC, Kim T, Chong YP, Lee SO, Choi SH, Kim YS, Woo JH, Kim SH, Yu E. Molecular detection of *Coxiella burnetii* from the formalin-fixed tissues of Q fever patients with acute hepatitis. *PLoS One.* 2017;12:e0180237.
- Janisch M, Farkas R. Laboratory rearing of the tick *Dermacentor marginatus* Sulz. *Parasitol Hung.* 1984;17:71–4.
- Jasinskas A, Zhong J, Barbour AG. Highly prevalent *Coxiella* sp. bacterium in the tick vector *Amblyomma americanum*. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:334-6.
- Jourdain E, Duron O, Séverine B, González-Acuña D, Sidi-Boumedine K. Molecular methods routinely used to detect *Coxiella burnetii* in ticks cross-react with *Coxiella*-like bacteria. *Infect Ecol Epidemiol.* 2015;5:29230.
- Kaaserer B, Rehacek J, Urvögly J, Kovacova E, Lukacova M, Kocianova E. First Isolation of the Q-Fever Agent, *Coxiella burnetii*, in *Ixodes ricinus*-Ticks in Tyrol (Austria) (Ixodides). *Ber. nat.-med. Verein Innsbruck* 1994;81:223-7.
- Kampschreur LM, Delsing CE, Groenwold RH, Wegdam-Blans MC, Bleeker-Rovers CP, de Jager-Leclercq MG, Hoepelman AI, van Kasteren ME, Buijs J, Renders NH, Nabuurs-Franssen MH, Oosterheert JJ, Wever PC. Chronic Q fever in the Netherlands 5 years after the start of the

Q fever epidemic: results from the Dutch chronic Q fever database. *J Clin Microbiol.* 2014;52:1637-43.

Karim S, Budachetri K, Mukherjee N, Williams J, Kausar A, Hassan MJ, Adamson S, Dowd SE, Apanskevich D, Arijo A, Sindhu ZU, Kakar MA, Khan RMD, Ullah S, Sajid MS, Ali A, Iqbal Z. A study of ticks and tick-borne livestock pathogens in Pakistan. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11:e0005681.

Karki S, Gidding HF, Newall AT, McIntyre PB, Liu BC. Risk factors and burden of acute Q fever in older adults in New South Wales: a prospective cohort study. *Med J Aust.* 2015;203:438.

Kauffmann M, Rehbein S, Hamel D, Lutz W, Heddergott M, Pfister K, Silaghi C. *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. in roe deer (*Capreolus capreolus*), fallow deer (*Dama dama*) and mouflon (*Ovis musimon*) in Germany. *Mol Cell Probes.* 2017;31:46-54.

Khavkin T, Tabibzadeh SS. Histologic, immunofluorescence, and electron microscopic study of infectious process in mouse lung after intranasal challenge with *Coxiella burnetii*. *Infect Immun.* 1988;56:1792-9.

Kiszewski AE, Matuschka FR, Spielman A. Mating strategies and spermiogenesis in ixodid ticks. *Annu Rev Entomol.* 2001;46:167-82.

Klyachko O, Stein BD, Grindle N, Clay K, Fuqua C. Localization and visualization of a *Coxiella*-type symbiont within the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:6584-94.

Klee SR, Tyczka J, Ellerbrok H, Franz T, Linke S, Baljer G, Appel B. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiol.* 2006;6:2.

Kocan KM, Yoshioka J, Sonenshine DE, de la Fuente J, Ceraul SM, Blouin EF, Almazán C. Capillary tube feeding system for studying tick-pathogen interactions of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). *J Med Entomol.* 2005;42:864-74.

Kordova N, Rehacek J. Experimental infection of ticks *in vivo* and their organs *in vitro* with filterable particles of *Coxiella burnetii*. *Acta Virol.* 1959;3:201-9.

- Kröber T, Guerin PM. An *in vitro* feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. *Pest Manag Sci*. 2007;63:17-22.
- Krull C, Böhme B, Clausen PH, Nijhof AM. Optimization of an artificial tick feeding assay for *Dermacentor reticulatus*. *Parasit Vectors*. 2017;10:60.
- Kubiak K, Dziekońska-Rynko J. Seasonal activity of the common European tick, *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758), in the forested areas of the city of Olsztyn and its surroundings. *Wiad Parazytol*. 2006;52:59-64.
- Kuhnert F, Diehl PA, Guerin PM. The life-cycle of the bont tick *Amblyomma hebraeum* *in vitro*. *Int J Parasitol*. 1995;25:887-96.
- Kuhnert F. Feeding of hard ticks *in vitro*: New perspectives for rearing and for the identification of systemic acaricides. *ALTEX*. 1996;13:76-87.
- Kuhnert F, Issmer AE, Grunewald J. Teilautomatisierte *in vitro* Fütterung adulter Schildzecken. *ALTEX* 1998;15:67-72.
- Labuda M, Jones LD, Williams T, Danielova V, Nuttall PA. Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks. *J Med Entomol*. 1993;30:295-9.
- Lees AD. The Sensory Physiology of the Sheep Tick, *Ixodes ricinus* L. *J Exp Biol*. 1948;25:145-207.
- Levin ML, Schumacher LB. Manual for maintenance of multi-host ixodid ticks in the laboratory. *Exp Appl Acarol*. 2016;70:343-67.
- Levin ML, Schumacher LBM, Snellgrove A. Effects of *Rickettsia amblyommatis* Infection on the Vector Competence of *Amblyomma americanum* Ticks for *Rickettsia rickettsii*. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2018;18:579-87.
- Li LH, Zhang Y, Zhu D. Effects of antibiotic treatment on the fecundity of *Rhipicephalus haemaphysaloides* ticks. *Parasit Vectors*. 2018;11:242. [LI et al. 2018a]
- Li LH, Zhang Y, Zhu D, Zhou XN. Endosymbionts Alter Larva-to-Nymph Transstadial Transmission of *Babesia microti* in *Rhipicephalus haemaphysaloides* Ticks. *Front Microbiol*. 2018;9:1415. [LI et al. 2018b]
- Li X, Dunley JE. Optimal sampling and spatial distribution of *Ixodes pacificus*, *Dermacentor occidentalis* and *Dermacentor variabilis* ticks (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol*. 1998;22:233-48.

- Liebig K, Boelke M, Grund D, Schicht S, Springer A, Strube C, Chitimia-Dobler L, Dobler G, Jung K, Becker S. Tick populations from endemic and non-endemic areas in Germany show differential susceptibility to TBEV. *Sci Rep.* 2020;10:15478.
- Liebisch A. Die Rolle einheimischer Zecken (Ixodidae) in der Epidemiologie des Q-Fiebers in Deutschland. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 1976;83:274-6.
- Liebisch A. Das Q-Fieber als Naturherdinfektion in Süddeutschland. *Bundesgesundheitsblatt* 1977;20:185-91.
- Liebisch A, Rahman MS. Prevalence of the ticks *Dermacentor marginatus* (Sulzer, 1776) and *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) and their importance as vectors of diseases in Germany. *Tropenmed Parasitol.* 1976;27:393-404.
- Liu XY, Cote M, Paul RE, Bonnet SI. Impact of feeding system and infection status of the blood meal on *Ixodes ricinus* feeding. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5:323-8.
- Machado-Ferreira E, Vizzoni VF, Balsemão-Pires E, Moerbeck L, Gazeta GS, Piesman J, Voloch CM, Soares CA. *Coxiella* symbionts are widespread into hard ticks. *Parasitol Res.* 2016;115:4691-9.
- Magdaş C, Magdaş VA, Mihalca AD, Baciú H, Gherman CM, Ştefănuţ CL, Lefkaditis M, Cozma V. Laboratory development of *Dermacentor marginatus* ticks (Acari: Ixodidae) at two temperatures. *Exp Appl Acarol.* 2015;67:309-15.
- Mancini F, Vescio MF, Toma L, Di Luca M, Severini F, Cacciò SM, Mariano C, Nicolai G, Laghezza Masci V, Fausto AM, Pezzotti P, Ciervo A. Detection of tick-borne pathogens in ticks collected in the suburban area of Monte Romano, Lazio Region, Central Italy. *Ann Ist Super Sanita.* 2019;55:143-50.
- Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12:518-53.
- McCaul TF, Williams JC. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *J Bacteriol.* 1981;147:1063-76.
- McIver SB. Structure of cuticular mechanoreceptors of arthropods. *Annu Rev Entomol.* 1975;20:381-97.
- Melenotte C, Lepidi H, Nappez C, Bechah Y, Audoly G, Terras J, Raoult D, Brégeon F. Mouse model of *Coxiella burnetii* aerosolization. *Infect Immun.* 2016;84:2116-23.

- Mendiola J, Alonso M, Marquetti MC, Finlay C. *Boophilus microplus*: multiple proteolytic activities in the midgut. *Exp Parasitol*. 1996;82:27-33.
- Michelet L, Joncour G, Devillers E, Torina A, Vayssier-Taussat M, Bonnet SI, Moutailler S. Tick species, tick-borne pathogens and symbionts in an insular environment off the coast of Western France. *Ticks Tick Borne Dis*. 2016;7:1109-15.
- Minichová L, Hamšíková Z, Mahríková L, Slovák M, Kocianová E, Kazimírová M, Škultéty Ľ, Štefanidesová K, Špitalská E. Molecular evidence of *Rickettsia* spp. in ixodid ticks and rodents in suburban, natural and rural habitats in Slovakia. *Parasit Vectors*. 2017;10:158.
- Morroy G, Keijmel SP, Delsing CE, Bleijenberg G, Langendam M, Timen A, Bleeker-Rovers CP. Fatigue following acute Q-Fever: A systematic literature review. *PLoS One*. 2016;11:e0155884.
- Mysterud A, Hatlegjerde IL, Sørensen OJ. Attachment site selection of life stages of *Ixodes ricinus* ticks on a main large host in Europe, the red deer (*Cervus elaphus*). *Parasit Vectors*. 2014;7:510.
- Nielsen SY, Mølbak K, Henriksen TB, Krogfelt KA, Larsen CS, Villumsen S. Adverse pregnancy outcomes and *Coxiella burnetii* antibodies in pregnant women, Denmark. *Emerg Infect Dis*. 2014;20:925–931.
- Nosek J, Lichard M, Sztankay M. The ecology of ticks in the Tribec and Hronský Inovec Mountains. *Bull World Health Organ*. 1967;36:49-59.
- Oliver JD, Lynn GE, Burkhardt NY, Price LD, Nelson CM, Kurtti TJ, Munderloh UG. Infection of immature *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) by membrane feeding. *J Med Entomol*. 2016;53:409-15.
- Olivieri E, Wijnveld M, Bonga M, et al. Transmission of *Rickettsia raoultii* and *Rickettsia massiliae* DNA by *Dermacentor reticulatus* and *Rhipicephalus sanguineus* (s.l.) ticks during artificial feeding. *Parasit Vectors*. 2018;11:494.
- Omsland A, Cockrell DC, Fischer ER, Heinzen RA. Sustained axenic metabolic activity by the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *J Bacteriol*. 2008;190:3203-12.
- Panjwani A, Shivaprakasha S, Karnad D. Acute Q Fever Pneumonia. *J Assoc Physicians India*. 2015;63:83-4.

- Pascucci I, Di Domenico M, Curini V, Cocco A, Averaimo D, D'Alterio N, Cammà C. Diversity of *Rickettsia* in ticks collected in Abruzzi and Molise Regions (Central Italy). *Microorganisms*. 2019;7:696.
- Patton TG, Brandt KS, Gilmore RD Jr. *Borrelia burgdorferi* visualized in *Ixodes scapularis* tick excrement by immunofluorescence. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012;12:1000-3.
- Perret JL, Guerin PM, Diehl PA, Vlimant M, Gern L. Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. *J Exp Biol*. 2003;206:1809-15.
- Pexara A, Solomakos N, Govaris A. A review on the seroprevalence of *Coxiella burnetii* in farm ruminants in various countries. *Vet Ital*. 2018;54:1113.
- Pilloux L, Baumgartner A, Jaton K, Lienhard R, Ackermann-Gäumann R, Beuret C, Greub G. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Coxiella burnetii* in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland: an underestimated epidemiologic risk. *New Microbes New Infect*. 2018;27:22-6.
- Philip CB. Observations on experimental Q fever. *J Parasitol*. 1948;34:457-64.
- Pluta S, Hartelt K, Oehme R, Mackenstedt U, Kimmig P. Prevalence of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. in ticks and rodents in southern Germany. *Ticks Tick Borne Dis*. 2010;1:145-7.
- Răileanu C, Tauchmann O, Vasić A, Neumann U, Tews BA, Silaghi C. Transstadial transmission and replication kinetics of West Nile Virus lineage 1 in laboratory reared *Ixodes ricinus* ticks. *Pathogens*. 2020;9:780.
- Reháček J, Brezina R. Detection of *Coxiella burnetii* in saliva of experimentally infected ticks, *Hyalomma dromedarii* Koch. *Bull World Health Organ*. 1968;39:974-7.
- Reháček J, Brezina R, Kováčová E, Zupancicová M. Haemocyte test--an easy, quick and reliable method for the detection of rickettsiae in ticks. *Acta Virol*. 1971;15:237-40.
- Ribeiro CC, Baêta Bde A, Valim JR, Teixeira RC, Cepeda PB, da Silva JB, da Fonseca AH. Use of plastic tips in artificial feeding of *Dermacentor* (*Anocentor*) *nitens* females Neumann, 1897 (Acari: Ixodidae). *Ticks Tick Borne Dis*. 2014;5:689-92.
- Richter D, Matuschka FR, Spielman A, Mahadevan L. How ticks get under your skin: insertion mechanics of the feeding apparatus of *Ixodes ricinus* ticks. *Proc Biol Sci*. 2013;280:20131758.
- Robert-Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2016. Berlin 2016; 183-5.

- Roest HIJ, Dinkla A, Koets AP, Post J, van Keulen L. Experimental *Coxiella burnetii* infection in non-pregnant goats and the effect of breeding. *Vet Res.* 2020;51:74.
- Roest HJ, van Gelderen B, Dinkla A, Frangoulidis D, van Zijderveld F, Rebel J, van Keulen L. Q fever in pregnant goats: pathogenesis and excretion of *Coxiella burnetii*. *PLoS One.* 2012;7:e48949.
- Robyn MP, Newman AP, Amato M, Walawander M, Kothe C, Nerone JD, Pomerantz C, Behravesh CB, Biggs HM, Dahlgren FS, Pieracci EG, Whitfield Y, Sider D, Ozaldin O, Berger L, Buck PA, Downing M, Blog D. Q Fever outbreak among travelers to Germany who received live cell therapy--United States and Canada, 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015;64:1071-3.
- Rubel F, Brugger K, Monazahian M, Habedank B, Dautel H, Leverenz S, Kahl O. The first German map of georeferenced ixodid tick locations. *Parasit Vectors.* 2014;7:477.
- Rubel F, Brugger K, Pfeffer M, Chitimia-Dobler L, Didyk YM, Leverenz S, Dautel H, Kahl O. Geographical distribution of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* in Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7:224-33.
- Samuel JE, Hendrix LR. Laboratory maintenance of *Coxiella burnetii*. *Curr Protoc Microbiol.* 2009;Chapter 6:Unit 6C.1.
- Sauer JR, McSwain JL, Bowman AS, Essenberg RC. Tick salivary gland physiology. *Annu Rev Entomol.* 1995;40:245-67.
- Schliesser T. Zur Epidemiologie und Bedeutung des Q-Fiebers bei Tieren. *Wien Tieraerztl Monat.* 1991;78: 7–12.
- Schötta AM, Wijnveld M, Stockinger H, Stanek G. Approaches for reverse Line Blot-Based detection of microbial pathogens in *Ixodes ricinus* ticks collected in Austria and impact of the chosen method. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83:e00489-17.
- Schulz J, Runge M, Schröder C, Ganter M, Hartung J. Detection of *Coxiella burnetii* in the air of a sheep barn during shearing. *Deut Tieraerztl Woch.* 2005;112:470–2.
- 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;39:56-65.

- 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;72:965-74.
- Šíroký P, Kubelová M, Modrý D, Erhart J, Literák I, Spitalská E, Kocianová E. Tortoise tick *Hyalomma aegyptium* as long term carrier of Q fever agent *Coxiella burnetii*-evidence from experimental infection. *Parasitol Res.* 2010;107:1515-20.
- Shannon JG, Howe D, Heinzen RA. Virulent *Coxiella burnetii* does not activate human dendritic cells: role of lipopolysaccharide as a shielding molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:8722-7.
- Smith DJW. Studies in the epidemiology of Q fever. 3. Transmission of Q fever by the tick *Haemaphysalis humerosa*. *Aust J Exp Biol Med.* 1940;18:1-8.
- Smith DJW. Studies in the epidemiology of Q fever. 8. The transmission of Q fever by the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Aust J Exp Biol Med.* 1941;19:133-6.
- Smith DJW. Studies in the epidemiology of Q fever. 11. Experimental infection of the ticks *Haemaphysalis bispinosa* and *Ornithodoros* sp. with *Rickettsia burneti*. *Aust J Exp Biol Med.* 1942;20:295-6.
- Smith TA, Driscoll T, Gillespie JJ, Raghavan R. A *Coxiella*-like endosymbiont is a potential vitamin source for the Lone Star tick. *Genome Biol Evol.* 2015;7:831-8.
- Soares SF, Louly CC, Marion-Poll F, Ribeiro MF, Borges LM. Study on cheliceral sensilla of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) involved in taste perception of phagostimulants. *Acta Trop.* 2013;126:75-83.
- Sojka D, Franta Z, Horn M, Caffrey CR, Mareš M, Kopáček P. New insights into the machinery of blood digestion by ticks. *Trends Parasitol.* 2013;29:276-85.
- Sonenshine DE, Hynes WL. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. *Front Biosci.* 2008;13:7046-63.
- Sonenshine DE, Roe RM. *Biology of ticks*. 2. Aufl. New York: Oxford University Press; 2014.
- Sprong H, Tijssse-Klasen E, Langelaar M, De Bruin A, Fonville M, Gassner F, Takken W, Van Wieren S, Nijhof A, Jongejan F, Maassen CB, Scholte EJ, Hovius JW, Emil Hovius K, Spitalská E, Van Duynhoven YT. Prevalence of *Coxiella burnetii* in ticks after a large outbreak of Q fever. *Zoonoses Public Health.* 2012;59:69-75.

Steere AC, Strle F, Wormser GP, Hu LT, Branda JA, Hovius JW, Li X, Mead PS. Lyme borreliosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16090.

Stein A, Raoult D. Detection of *Coxiella burnetii* by DNA amplification using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992;30:2462-6.

Stein A, Saunders NA, Taylor AG, Raoult D. Phylogenetic homogeneity of *Coxiella burnetii* strains as determined by 16S ribosomal RNA sequencing. *FEMS Microbiol Lett*. 1993;113:339-44.

Sting R, Breitling N, Oehme R, Kimmig P. Untersuchungen zum Vorkommen von *Coxiella burnetii* bei Schafen und Zecken der Gattung *Dermacentor* in Baden-Württemberg. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 2004;111:390-4.

Stoker MG, Fiset P. Phase variation of the Nine Mile and other strains of *Rickettsia burnetii*. *Can J Microbiol*. 1956;2:310-21.

Szymańska-Czerwińska M, Galińska EM, Niemczuk K, Zasepa M. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in foresters and ticks in the south-eastern Poland and comparison of diagnostic methods. *Ann Agric Environ Med*. 2013;20:699-704.

Tajeri S, Razmi G, Haghparast A. Establishment of an artificial tick feeding system to study *Theileria lestoquardi* infection. *PLoS One*. 2016;11:e0169053.

Tissot-Dupont H, Amadei MA, Nezri M, Raoult D. Wind in November, Q fever in December. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:1264-9.

Tomanović S, Chochlakis D, Radulović Z, Milutinović M, Cakić S, Mihaljica D, Tselentis Y, Psaroulaki A. Analysis of pathogen co-occurrence in host-seeking adult hard ticks from Serbia. *Exp Appl Acarol*. 2013;59:367-76.

Trentelman JJ, Kleuskens JA, van de Crommert J, Schetters TP. A new method for *in vitro* feeding of *Rhipicephalus australis* (formerly *Rhipicephalus microplus*) larvae: a valuable tool for tick vaccine development. *Parasit Vectors*. 2017;10:153.

Umemiya-Shirafuji R, Hatta T, Okubo K, Sato M, Maeda H, Kume A, Yokoyama N, Igarashi I, Tsuji N, Fujisaki K, Inoue N, Suzuki H. Transovarial persistence of *Babesia ovata* DNA in a hard tick, *Haemaphysalis longicornis*, in a semi-artificial mouse skin membrane feeding system. *Acta Parasitol*. 2017;62:836-41.

- Valarcher JF, Hägglund S, Juremalm M, Blomqvist G, Renström L, Zohari S, Leijon M, Chirico J. Tick-borne encephalitis. *Rev Sci Tech.* 2015;34:453-66.
- Valim JR, Rangel CP, Baêta BA, Ribeiro CC, Cordeiro MD, Teixeira RC, Cepeda PB, Fonseca AH. Using plastic tips in artificial feeding of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) females. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2017;26:110-4.
- Van den Brom R, van Engelen E, Roest HI, van der Hoek W, Vellema P. *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: an opinionated review. *Vet Microbiol.* 2015;181:119-29.
- Van Duijvendijk G, Gort G, Sprong H, Takken W. Behavioural responses of *Ixodes ricinus* nymphs to carbon dioxide and rodent odour. *Med Vet Entomol.* 2017;31:220-3.
- Van Roeden SE, Reukers DFM, van Jaarsveld CHM, Kampschreur LM, Hoepelman IM, Wever PC, Bleeker-Rovers CP, Oosterheert JJ. Chronic Q fever: patient and treatment-related factors influencing long-term quality of life. *QJM.* 2018;111:791-7.
- Vassallo M, Pérez-Eid C. Comparative behavior of different life-cycle stages of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) to human-produced stimuli. *J Med Entomol.* 2002;39:234-6.
- Voigt WP, Young AS, Mwaura SN, Nyaga SG, Njihia GM, Mwakima FN, Morzaria SP. *In vitro* feeding of instars of the ixodid tick *Amblyomma variegatum* on skin membranes and its application to the transmission of *Theileria mutans* and *Cowdria ruminantium*. *Parasitology.* 1993;107:257-63.
- Von Wissmann B, Hautmann W, Sing A, Hizo-Teufel C, Fingerle V. Assessing the risk of human granulocytic anaplasmosis and lyme borreliosis after a tick bite in Bavaria, Germany. *Int J Med Microbiol.* 2015;305:736-41.
- Waladde SM, Young AS, Mwaura SN, Njihia GN, Mwakima FN. Optimization of the *in vitro* feeding of *Rhipicephalus appendiculatus* nymphae for the transmission of *Theileria parva*. *Parasitology.* 1995;111:463-8.
- Waladde SM, Young AS, Morzaria SP. Artificial feeding of ixodid ticks. *Parasitol Today.* 1996;12:272-8.
- Wallenhammar A, Lindqvist R, Asghar N, Gunaltay S, Fredlund H, Davidsson Å, Andersson S, Överby AK, Johansson M. Revealing new tick-borne encephalitis virus foci by screening antibodies in sheep milk. *Parasit Vectors.* 2020;13:185.

- Walker AR, Bouattour A, Camicas JL, Estrada-Peña A, Horak IG, Latif AA, Pegram RG, Preston, PM. Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. Edinburgh Scotland, U.K.: Bioscience Reports, 2003.
- Walter M, Brugger K, Rubel F. The ecological niche of *Dermacentor marginatus* in Germany. Parasitol Res. 2016;115:2165-74.
- Weisburg WG, Dobson ME, Samuel JE, Dasch GA, Mallavia LP, Baca O, Mandelco L, Sechrest JE, Weiss E, Woese CR. Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. J Bacteriol. 1989;171:4202-6.
- Wielders CC, Wijnbergen PC, Renders NH, Schellekens JJ, Schneeberger PM, Wever PC, Hermans MH. High *Coxiella burnetii* DNA load in serum during acute Q fever is associated with progression to a serologic profile indicative of chronic Q fever. J Clin Microbiol. 2013;51:3192-8.
- Wilson K, Elston D. What's eating you? *Ixodes* tick and related diseases, Part 1: Life cycle, local reactions, and Lyme disease. 2018;101:187-90.
- Wright CL, Gaff HD, Sonenshine DE, Hynes WL. Experimental vertical transmission of *Rickettsia parkeri* in the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum*. Ticks Tick Borne Dis. 2015;6:568-73.
- Xu XL, Cheng TY, Yang H, Yan F. Identification of intestinal bacterial flora in *Rhipicephalus microplus* ticks by conventional methods and PCR-DGGE analysis. Exp Appl Acarol. 2015;66:257-68.
- Young AS, Waladde SM, Morzaria SP. Artificial feeding systems for ixodid ticks as a tool for study of pathogen transmission. Ann N Y Acad Sci. 1996;791:211-8.
- Zeman P. Objective assessment of risk maps of tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis based on spatial patterns of located cases. Int J Epidemiol. 1997;26:1121-9.
- Zheng H, Li AY, Teel PD, Pérez de León AA, Seshu J, Liu J. Biological and physiological characterization of *in vitro* blood feeding in nymph and adult stages of *Ornithodoros turicata* (Acari: Argasidae). J Insect Physiol. 2015;75:73-9.
- Zhong J. *Coxiella*-like endosymbionts. Adv Exp Med Biol. 2012;984:365-79.
- Zöldi V, Reiczigel J, Egyed L. Monitoring the diel activity of *Ixodes ricinus* ticks in Hungary over three seasons. Exp Appl Acarol. 2013;61:509-17.

## Literaturverzeichnis

Župančičová-Majerska, M., Reháček, J., & Kováčová, E. Localization of *Coxiella burnetii* and *Rickettsiae* of the Rocky Mountain spotted fever group in ticks. *Acta Virol.* 1972;16:63-70.

## 8 Anhang

### 8.1 Bilder der Zeckenfütterung

Fotografien Makert/Körner © Fraunhofer IZI

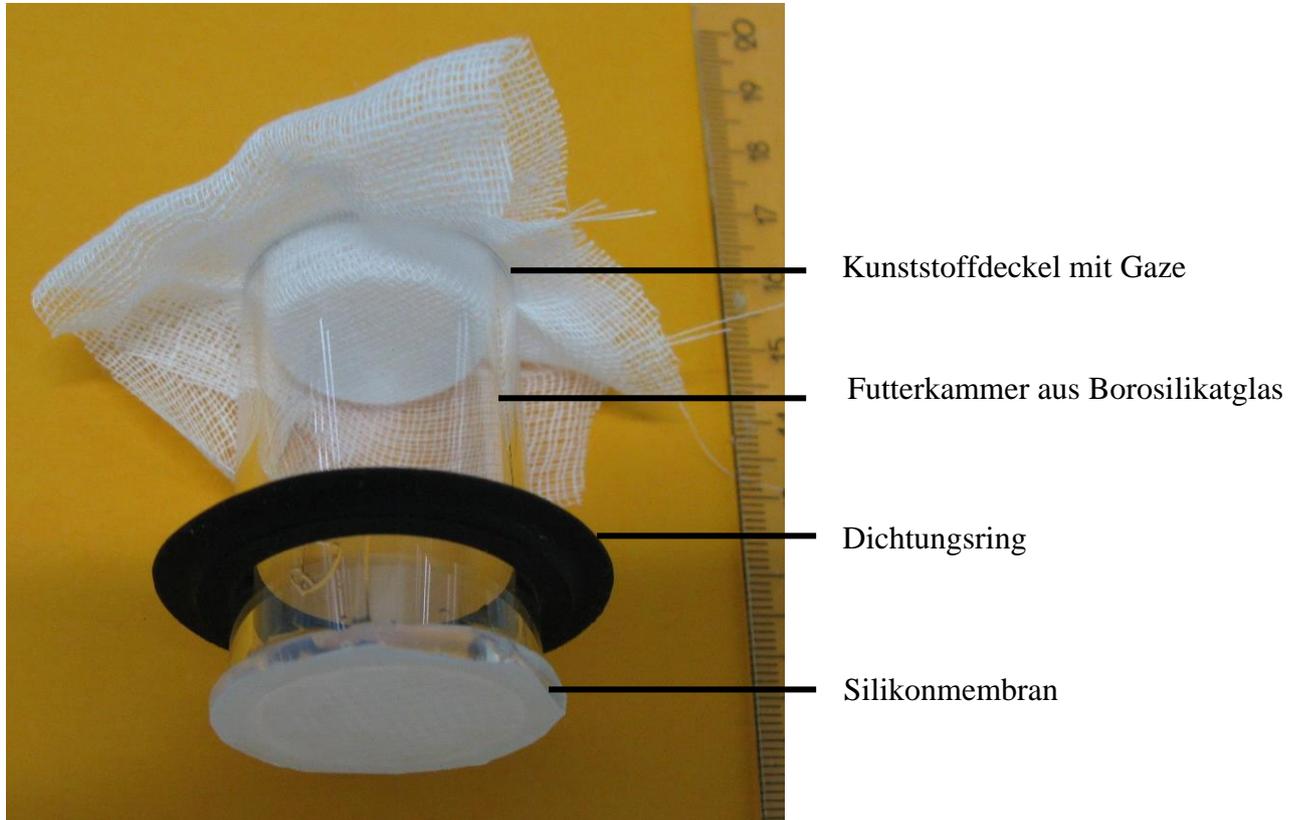


Abb. 1: Fütterungskammer nach KRÖBER und GUERIN (2007) zur Zeckenfütterung

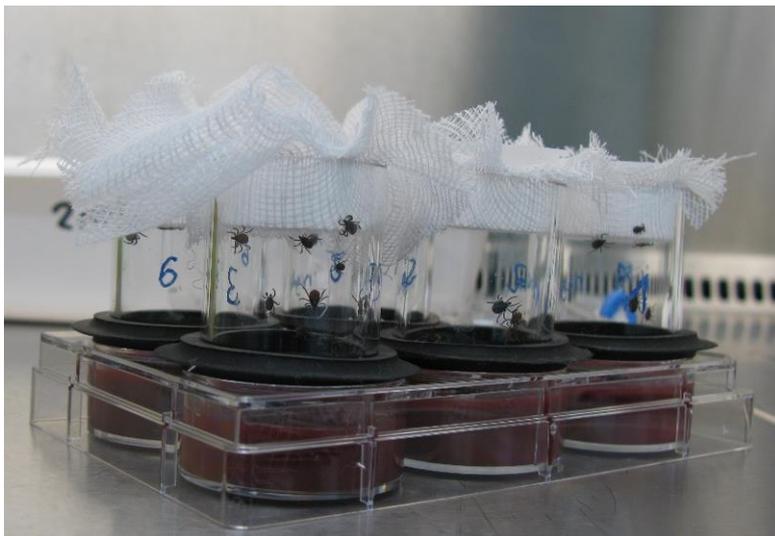


Abb. 2: Fütterungssystem in 6-Well-Platte mit adulten *I. ricinus*

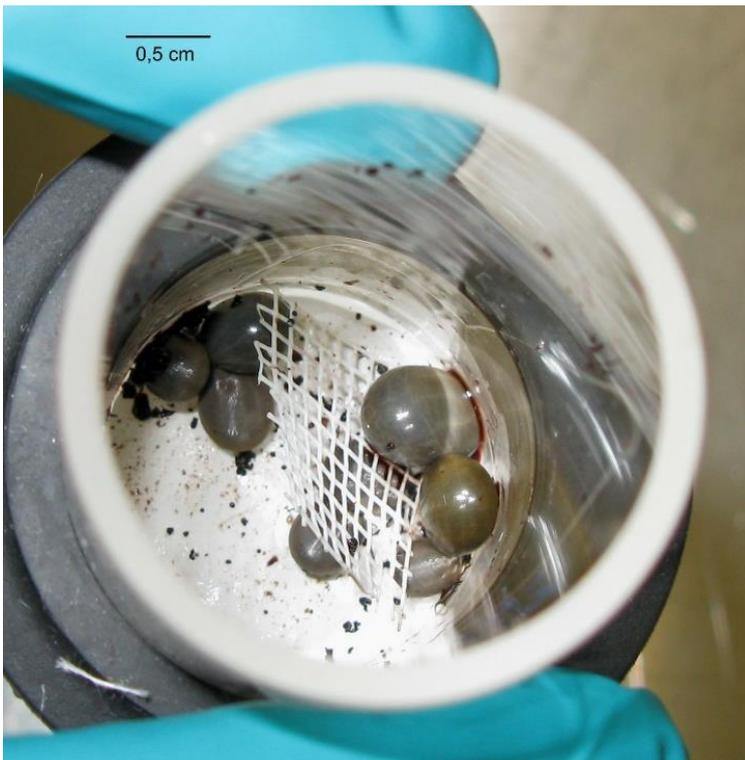


Abb. 3: Fütterung adulter *I. ricinus* in der zweiten Woche



Abb. 4: Weibliche *I. ricinus* während Häutung

## 9 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Martin Pfeffer für die exzellente Betreuung durch die Promotionszeit hinweg besonders bedanken. Insbesondere als externe Doktorandin weiß ich die schnellen Rückmeldungen und kompetenten Antworten sehr zu schätzen. Die Gespräche und Anregungen waren immer außerordentlich hilfreich und einiges Wissen wäre mir ohne jene verborgen geblieben.

Besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Impfstofftechnologien am Fraunhofer IZI für die herzliche Aufnahme, die Unterstützung vor Ort und über meine Anwesenheit hinaus. Ich möchte mich insbesondere bei PD Dr. Sebastian Ulbert für die konstruktiven Hinweise und Hilfe bedanken sowie bei Dr. Gustavo R. Makert dos Santos für die Einführung in die Welt der Arthropoden und die stete und fachkundige Unterstützung bei allen Unsicherheiten. Steffen Jakob danke ich sehr für die Hilfe bei den langwierigen Fütterungsversuchen und die Begeisterung für Zecken. Vielen Dank auch an Dr. Jasmin Fertey, Dr. Alexandra Rockstroh, Beatrice Berneck, Ulrike Ehlert, Julia Finkensieper und Anne Matiebe für eure Hilfsbereitschaft innerhalb und außerhalb des Labors.

Für die Betreuung am Friedrich-Loeffler-Institut möchte ich mich herzlich bei Dr. Katja Mertens-Scholz bedanken. Danke für das immer offene Ohr und die vielen hilfreichen Ideen und Korrekturen. Ebenfalls gebührt mein Dank Dr. Klaus Henning für die Begleitung durch die Anfangszeit und Prof. Dr. Heinrich Neubauer für die Übernahme der Betreuung im Rahmen der Graduiertenschule. Weiterhin möchte ich allen unterstützenden Mitarbeiter\*innen meinen Dank aussprechen, insbesondere Mandy Rabe, Petra Sippach, Ines Lemser und Uta Pfeil.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Co-Autoren Prof. Dr. Ard Nijhof und Prof. Dr. Alexander Starke, sowie den Mitgliedern des Q-GAPS-Verbundes für die gute Zusammenarbeit und die hilfreichen Vorschläge.

Vielen Dank den FLI-Doktorand\*innen, insbesondere Jennifer Andrack und Mareike Stellfeld, dass ihr in Jena – ob auf Arbeit, beim Wandern oder auf der Saale – immer für mich da wart.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre Begleitung und ihren Rückhalt durch das Studium und die Promotionszeit hinweg einen großen Anteil an der Erstellung dieser Doktorarbeit haben. Dabei danke ich insbesondere den Hirschen Johanna Fürst, Rebecca Großmann und Jil Waade für den über das Studium hinaus währenden Zusammenhalt. Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie und Daniel. Ihr gebt mir, wenn es einmal schwierig ist, immer die Motivation, Zuversicht und Zuspruch, die ich brauche.