

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

**Einfluss von Umwelt- und individuellen Faktoren auf die Prävalenz von *Rickettsia* spp. in
Kleinsäugetern und Zecken**

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

eingereicht von
Charlotte Arz
aus Saarbrücken

Leipzig, 2024

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, Universität Leipzig, Leipzig

Prof. Dr. Christina Strube, Institut für Parasitologie, Stiftung Tierärztliche
Hochschule Hannover, Hannover

Tag der Verteidigung: 07.05.2024

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1	ZECKEN	3
2.1.1	<i>Taxonomie der Zecken</i>	3
2.1.2	<i>Habitat der Zecken</i>	3
2.1.3	<i>Lebenszyklus, Blutmahlzeiten, Wirte</i>	4
2.1.4	<i>Transmissionswege von Pathogenen innerhalb einer Zeckenpopulation</i>	5
2.1.5	<i>Vektorfunktion von Ixodes ricinus</i>	6
2.1.6	<i>Vektorfunktion von Dermacentor reticulatus</i>	7
2.2	KLEINSÄUGER	8
2.2.1	<i>Taxonomie</i>	8
2.2.2	<i>Wühlmäuse der Gattung Microtus</i>	9
2.2.3	<i>Die Wühlmause Clethrionomys glareolus und Arvicola amphibius</i>	10
2.2.4	<i>Echte Mäuse der Gattung Apodemus</i>	11
2.2.5	<i>Spitzmäuse: Sorex spp. und Crocidura russula</i>	12
2.3	RICKETTSIA SPP.	13
2.3.1	<i>Taxonomie und Aufbau des Bakteriums</i>	13
2.3.2	<i>Vektoren von Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe (SFG) und Übertragung auf den Wirt</i>	14
2.3.3	<i>Verbreitung von Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe in Deutschland, Europa, Welt</i>	15
3	PUBLIKATION.....	19
4	DISKUSSION	38
5	ZUSAMMENFASSUNG	48
6	SUMMARY	50
7	ANHANG/REFERENZEN	52
7.1	LITERATURVERZEICHNIS	52
7.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	62
7.3	TABELLENVERZEICHNIS	62
8	DANKSAGUNG	63

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. agrarius</i>	<i>Apodemus agrarius</i> (Brandmaus)
<i>A. phagocytophilum</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>
<i>A. terrestris</i>	<i>Arvicola terrestris</i> (Schermaus)
<i>A. flavicollis</i>	<i>Apodemus flavicollis</i> (Gelbhalsmaus)
<i>A. sylvaticus</i>	<i>Apodemus sylvaticus</i> (Waldmaus)
<i>B. burgdorferi</i> s.l.	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato
<i>B. microti</i>	<i>Babesia microti</i>
bzw.	beziehungsweise
<i>C. rusulla</i>	<i>Crocidura russula</i> (Hausspitzmaus)
<i>Cl. glareolus</i>	<i>Clethrionomys glareolus</i> (Rötelmaus)
<i>D. reticulatus</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i> (Auwaldzecke)
et al.	et alia (und andere)
<i>F. tularensis</i>	<i>Francisella tularensis</i>
FSME-Virus	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
GLMM	generalised linear mixed model (linear gemischtes generalisiertes Model)
<i>gltA</i>	Citrat-Synthase-Gen
<i>I. inopinatus</i>	<i>Ixodes inopinatus</i>
<i>I. ricinus</i>	<i>Ixodes ricinus</i> (gemeiner Holzbock)
KI	Konfidenzintervall
LIV	Louping-ill-Virus
<i>M. agrestis</i>	<i>Microtus agrestis</i> (Erdmaus)
<i>M. arvalis</i>	<i>Microtus arvalis</i> (Feldmaus)
Mb	megabases
MSF	Mediterranean spotted fever (Mittelmeer-Zeckenfleckfieber)
<i>ompA</i>	outer membrane protein A
<i>ompB</i>	outer membrane protein B
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
qPCR	quantitative real-time polymerase chain reaction (quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
<i>R. africae</i>	<i>Rickettsia africae</i>

<i>R. akari</i>	<i>Rickettsia akari</i>
<i>R. australis</i>	<i>Rickettsia australis</i>
<i>R. bellii</i>	<i>Rickettsia bellii</i>
<i>R. canadensis</i>	<i>Rickettsia canadensis</i>
<i>R. conorii</i>	<i>Rickettsia conorii</i>
<i>R. felis</i>	<i>Rickettsia felis</i>
<i>R. helvetica</i>	<i>Rickettsia helvetica</i>
<i>R. japonica</i>	<i>Rickettsia japonica</i>
<i>R. massiliae</i>	<i>Rickettsia massiliae</i>
<i>R. monacensis</i>	<i>Rickettsia monacensis</i>
<i>R. raoultii</i>	<i>Rickettsia raoultii</i>
<i>R. rickettsii</i>	<i>Rickettsia rickettsii</i>
<i>R. slovaca</i>	<i>Rickettsia slovaca</i>
<i>S. araneus</i>	<i>Sorex araneus</i> (Waldspitzmaus)
<i>S. minutus</i>	<i>Sorex minutus</i> (Zwergspitzmaus)
SA	Republik Südafrika
SENLAT	Scalp eschars and neck lymphadenopathy after tick bites
SFG	Spotted fever group (Zeckenstichfieber-Gruppe)
spp.	spezies pluralis
STG	Scrub typhus group (Tsutsugamushi-Fieber-Gruppe)
TG	Typhus group (Fleckfieber-Gruppe)
USA	United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Zecken gehören zu den obligat blutsaugenden Arthropoden, welche je nach Spezies in unterschiedlichen Habitaten vorkommen. In Mitteleuropa sind die am weitesten verbreiteten Arten der gemeine Holzbock (*Ixodes ricinus*) und die Auwaldzecke (*Dermacentor reticulatus*) (RUBEL et al. 2023). Erstere ist in verschiedenen Lebensräumen von Waldgebieten, über Wiesen, hin zu städtischen Räumen zu finden (GRAY et al. 2021). Letztere ist nicht gleichermaßen tolerant und kommt hauptsächlich in Geländen mit Heiden, Wiesen und offenen Waldgebieten vor (MEDLOCK et al. 2017, KOHN et al. 2019). Beide Arten sind dreiwirtige Ektoparasiten (FÖLDVÁRI et al. 2016, KAHL und GRAY 2023). Während alle blutsaugenden Lebensstadien (Larve, Nymphe, Adulte) von *I. ricinus* aktiv auf Wirte lauern, zeigen bei *D. reticulatus* nur die adulten Zecken diese Verhaltensweise (FÖLDVÁRI et al. 2016, KAHL und GRAY 2023). Die subadulten Lebensstadien (Larve, Nymphe) sind Nesthocker und leben in den Bauen und Nestern ihrer Wirte (FÖLDVÁRI et al. 2016). Die Hauptwirte der subadulten Stadien beider Zeckenspezies sind vor allem Kleinsäuger. Die adulten Stadien nutzen eher größere Säuger als Wirt (HORNOK 2017, OTRANTO et al. 2017). Zecken können für verschiedene Pathogene wie Viren, Bakterien und Protozoen, welche während des Blutsaugens auf den Wirt (Tier oder Mensch) übertragen werden, als Vektor dienen.

Kleinsäuger dienen als Reservoir für viele dieser Pathogene, wie beispielsweise für *Borrelia burgdorferi* sensu lato, die die häufigste zeckenübertragbare Krankheit in Europa (Lyme Borreliose) auslösen können (TILLY et al. 2008, RIZZOLI et al. 2011, BURRI et al. 2014). Ihre Bedeutung als Reservoir für die Bakterien *Rickettsia* spp. ist noch nicht endgültig geklärt (SPRONG et al. 2009, BURRI et al. 2014). Durch die spezielle Rolle der Kleinsäuger als Wirt und/oder Reservoir kommt der Zusammensetzung des Habitats, nicht nur in Bezug auf das Vorkommen und die Diversität der Kleinsäugerspezies eine immense Bedeutung zu, sondern könnte gleichzeitig auf das Vorkommen von Schildzecken mitsamt ihren Pathogenen einwirken (KRAWCZYK et al. 2020).

Der Großteil der obligat intrazellulären Rickettsien wird von Zecken übertragen, was die numerisch größte Gruppe, die Zeckenstichfieber-Gruppe (SFG), miteinschließt (MERHEJ und RAOULT 2011). Innerhalb der Zeckenpopulation werden Rickettsien hauptsächlich transstadial, sexuell und transovariell übertragen (DEPLAZES et al. 2013, KARBOWIAK et al. 2016, RAVINDRAN et al. 2023). Die von Rickettsien ausgelösten Zoonosen, die Rickettsiosen,

umfassen ein Spektrum von milden Grippesymptomen bis hin zu tödlichen Verläufen. In Deutschland vorkommende zeckenübertragene Rickettsienarten der SFG sind *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia monacensis*, *Rickettsia raoultii*, *Rickettsia massiliae* und *Rickettsia slovaca* (DOBLER und PFEFFER 2012). Die von diesen Spezies ausgelösten Rickettsiosen haben meistens einen milden Verlauf (PAROLA et al. 2013, AZAGI et al. 2020, BUCZEK et al. 2020). Verschiedene Zeckenarten werden mit verschiedenen Rickettsienarten assoziiert. So wird *Rickettsia helvetica* hauptsächlich von *I. ricinus* übertragen, *R. raoultii* hauptsächlich von *Dermacentor*-Arten wie z.B. *D. reticulatus* (BUCZEK et al. 2020, KNOLL et al. 2021b). Die Prävalenz von Rickettsien in Zecken wurde intensiv in Abhängigkeit von Faktoren wie Saison, Lebensstadium und verschiedenen Landschaftsattributen untersucht (REYE et al. 2010, ŠPITALSKÁ et al. 2014, KNOLL et al. 2021b). Seltener existieren demgegenüber Studien aus Europa, welche andere demographische Faktoren wie das Habitat der Zecken und das Kleinsäugervorkommen, inklusive der Rickettsienprävalenz integrieren. Zusätzlich stellen Studien über Ko-Infektionen von Rickettsien und Borrelien in Zecken und insbesondere in Kleinsäugetieren eine Ausnahme dar (RAULF et al. 2018, KNOLL et al. 2021a). Ziel dieser Studie war es daher, Zecken und Kleinsäugetiere aus verschiedenen Habitaten von Untersuchungsstandorten um den Hainich-Dün Nationalpark in Thüringen zu untersuchen. Dabei wurde neben der Verbreitung, der Rickettsienprävalenz in den Proben und der Identifizierung der Rickettsienspezies, der Einfluss von landschaftlichen und individuellen Faktoren auf die Rickettsienprävalenz untersucht. Dazu zählten bei Kleinsäugetieren Saison, Kleinsäugetierspezies und Habitat und bei den Zecken Saison, Zeckenspezies, Lebensstadium und Habitat. Des Weiteren wurden die Ko-Infektionsraten mit *Rickettsia* spp. und *Borrelia* spp. in Zecken und Kleinsäugetieren analysiert.

2 Literaturübersicht

2.1 Zecken

2.1.1 Taxonomie der Zecken

Zecken sind weltweit vorkommende obligat hämatophage Ektoparasiten. Sie gehören dem Stamm der Arthropoda (Gliederfüßer) an und sind eine Ordnung der Acari (Milben). Zecken werden in die drei Familien eingeteilt: Ixodidae (Schildzecken), Argasidae (Lederzecken) und Nuttalliellidae (PETNEY et al. 2017). Die Familie der Ixodidae umfasst hauptsächlich die sechs Genera *Amblyomma* spp., *Dermacentor* spp., *Haemaphysalis* spp., *Hyalomma* spp., *Ixodes* spp. und *Rhipicephalus* spp.; die Familie der Argasidae die zwei Genera *Argas* spp. und *Ornithodoros* spp.; und die Familie der Nuttalliellidae nur eine Spezies namens *Nuttalliella namaqua* (BOULANGER et al. 2019). Zeckengenera der Ixodidae, die in Deutschland als heimisch gelten, sind *Ixodes* spp., *Dermacentor* spp. und *Haemaphysalis* spp. (RUBEL et al. 2021). *Rhipicephalus* spp. und *Hyalomma* spp. werden reisebedingt durch Hunde beziehungsweise Zugvögel importiert. Es gilt jedoch als unwahrscheinlich, dass diese Zeckengattungen unter derzeitigen klimatischen Bedingungen eine Population in Deutschland aufbauen können (PETNEY et al. 2012, RUBEL et al. 2021, UITERWIJK et al. 2021).

Die am häufigsten vorkommende und untersuchte Zeckenart in Mitteldeutschland ist der gemeine Holzbock (*Ixodes ricinus*, Linnaeus, 1758) der Gattung *Ixodes* spp. (RUBEL et al. 2021). Im Jahr 2014 wurde eine eng verwandte Zeckenart beschrieben: *Ixodes inopinatus* (ESTRADA-PEÑA et al. 2014). Die morphologischen Unterscheidungskriterien dieser beiden Spezies sind nicht ausreichend voneinander abgrenzbar, um eine sichere Trennung der Spezies treffen zu können (ROLLINS et al. 2023). Häufig werden *I. ricinus* und *I. inopinatus* deshalb (unter dem Begriff *Ixodes ricinus*-Komplex) zusammengefasst betrachtet. In Deutschland vorkommende Zecken der Gattung *Dermacentor* spp. sind die Auwaldzecke (*Dermacentor reticulatus*, Fabricius, 1794) und die Schafzecke (*Dermacentor marginatus*, Sulzer, 1776) (RUBEL et al. 2023).

2.1.2 Habitat der Zecken

In Europa werden Zecken vom Mittelmeer bis Nordskandinavien gefunden (HVIDSTEN et al. 2014). Mitteldeutschland befindet sich in der gemäßigten Klimazone. Das von *D. reticulatus* bevorzugte Habitat umschließt Weiden, Sträucher, Wiesen und offene Waldgebiete (NOWAK-CHMURA und SIUDA 2012, KOHN et al. 2019). Adulte Individuen von *I. ricinus* sind

unterschiedlichen Vegetationen gegenüber tolerant. Sie kommen in verschiedenen Wäldern und Gebüschern vor (NOWAK-CHMURA und SIUDA 2012). Alle Lebensstadien benötigen jedoch eine relative Luftfeuchte von über 80 % (NOWAK-CHMURA und SIUDA 2012). Besonders die subadulten Stadien sind empfindlich gegenüber Austrocknung bei höheren Temperaturen und Trockenheit. Während des Ausharrens auf potenzielle Wirte, lauern die Zecken nach Erklimmen der Vegetation in einem ungeschützten, exponierten Zustand (DEPLAZES et al. 2013). Für die Wiederherstellung eines ausbalancierten Wasserhaushalts ziehen sie sich in die obere Laubschicht zurück. In dieser Schicht ist Schutz vor direkter Sonneneinstrahlung gegeben und eine höhere relative Luftfeuchte vorhanden. Aufgrund ihrer besonderen Anfälligkeit sind subadulte Lebensstadien dieser Zeckenspezies vermehrt in dichteren Waldgebieten und weniger in Wiesen zu finden (PERRET et al. 2000).

2.1.3 Lebenszyklus, Blutmahlzeiten, Wirte

Die vier Entwicklungsstadien der Zecke sind Ei, Larve, Nymphe und Adulte (weiblich und männlich). Larve, Nymphe und Adulte sind dabei aktive Lebensstadien, die Blut saugen. Nach jeder Blutmahlzeit erfolgt eine Häutung und Weiterentwicklung zum nächsten Lebensstadium, beziehungsweise im Falle des Weibchens die Kopulation und Eiablage (APANASKEVICH et al. 2013). Männliche Zecken haben ein Schild, welches den ganzen Rücken bedeckt und nehmen daher kein, beziehungsweise nur eine geringe Menge Blut auf (OLIVER JR 1989).

Die meisten Schildzecken haben einen Lebenszyklus, der drei Wirte umschließt (APANASKEVICH et al. 2013). Anhand der Art der Wirtsbeschaffung lassen sich Schildzecken in exophile Zecken (z.B. *I. ricinus* und *Ixodes persulcatus*) und endophile Zecken (z.B. *Ixodes hexagonus*) einteilen (GRAY et al. 2014, RANDOLPH 2014). Bei manchen Arten zeigen die subadulten Zeckenstadien ein endophiles Verhalten, die adulten ein exophiles (z.B. *D. reticulatus*) (MEDLOCK et al. 2017). Exophile Zecken warten in der Vegetation auf Kontakt mit ihrem Wirt (MEJLON und JAENSON 1997). Endophile Zecken leben in unmittelbarer Nähe beziehungsweise innerhalb von Bauen oder Häusern der Wirte (WALKER 2018). Da auf dem Wirt ausschließlich Blutaufnahme und Kopulation stattfindet, verbringen Schildzeckenarten mehr als 90 % (*I. ricinus*: ≥ 99 %) ihres Lebens abseits des Wirts (DEPLAZES et al. 2013, KAHL und GRAY 2023).

Wirte werden von Zecken hauptsächlich mithilfe des Hallerschen Organs gefunden. Dieses liegt am Tarsus des ersten Beinpaars und ist mit Sensillen ausgestattet, welche unter anderem

Temperatur, Vibrationen, und Duftstoffe wahrnehmen können. Des Weiteren können chemische Verbindungen wie CO₂ über spezielle Rezeptoren wahrgenommen werden (DEPLAZES et al. 2013). Exophile Zecken erklimmen die Vegetation, exponieren aktiv ihre Hallerschen Organe um einen Wirt zu detektieren und warten bis ein solcher sie abstreift. Auf dem Wirt suchen sie eine passende Stichstelle, insbesondere Körperregionen mit wenig Haar und dünner Haut (KIFFNER et al. 2011). Mit ihren Schneidewerkzeugen, den Chelizeren, eröffnen sie die Epidermis, um ihr Hypostom zur Blutaufnahme in die untere Hautschicht einzuführen (BOULANGER et al. 2019). Durch die Produktion von antiinflammatorischen Substanzen im Speichel bleiben die Stiche meist unbemerkt (BLANTON 2019).

Nachdem sie vollgesogen sind, lassen sie sich abfallen und häuten sich entweder zum nächsten Lebensstadium oder legen im Falle des Weibchens Eier an einem geschützten Standort. *Ixodes ricinus* Weibchen legen etwa 3000 Eier, die von *D. reticulatus* 3000-4500 Eier (DEPLAZES et al. 2013). Männchen suchen meist lediglich zum Zwecke der Paarung einen Wirt auf. Bei der Wirtauswahl sind *I. ricinus* Zecken sehr tolerant. Larven haben im Vergleich zu Nymphen und adulten Zecken einen geringeren Aktionsradius und sind vor allem auf Kleinsäugetern wie Nagern und Insektenfressern zu finden, ebenfalls auf Vögeln und Reptilien. Nymphen und adulte Zecken finden sich zusätzlich vermehrt auf größeren Säugern (DEPLAZES et al. 2013). Das Wirtspektrum der subadulten *D. reticulatus* Zecke umschließt hauptsächlich Kleinsäuger. Das des adulten Stadiums auch größere Wirte (DEPLAZES et al. 2013). Die Blutmahlzeiten dauern für Larven 3-6 Tage, für Nymphen 3-10 Tage und für Weibchen 6-12 Tage. Die genaue Dauer ist hierbei abhängig von verschiedenen Faktoren wie Spezies, Temperatur und Wirt (APANASKEVICH et al. 2013).

2.1.4 Transmissionswege von Pathogenen innerhalb einer Zeckenpopulation

Zecken sind Reservoirs und Vektoren vieler Pathogene mit großer human- und veterinärmedizinischer Relevanz. Unter anderem handelt es sich um Viren, Protozoen, Bakterien und Parasiten. Von besonderer Bedeutung innerhalb der Bakterien sind Borrelien, Neoehrlichien und Rickettsien zu nennen. Im Verlauf der Blutmahlzeit werden Pathogene über den Zeckenspeichel auf den Wirt übertragen. Hierbei unterscheiden sich die Zeitpunkte der Übertragung der Pathogene teilweise erheblich. Während die Transmission des Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)-Virus bereits kurz nach dem Stich beginnt, dauert es bei einer mit *Borrelia* spp. infizierten Zecke zunächst einige Stunden bevor eine Übertragung stattfindet (DOBLER et al. 2012).

Innerhalb der Zeckenpopulation können Pathogene über verschiedene Wege übertragen werden: transstadial, transovariell und sexuell. Dabei können nicht alle Pathogene über jeden dieser Transmissionswege übertragen werden. Wenn eine Infektion auch nach der Weiterentwicklung zur nächsten Entwicklungsstufe der Zecke weiter besteht, spricht man von transstadialer Übertragung (DEPLAZES et al. 2013). Beispiele für Pathogene, bei denen es unter anderem zu dieser Art der Übertragung kommt, sind Rickettsien und das FSME-Virus (KARBOWIAK und BIERNAT 2016, KARBOWIAK et al. 2016). Transovarielle Übertragung ist die Weitergabe der Pathogene von Weibchen auf ihre Eier, wie sie beispielsweise bei einigen Rickettsien und Babesien vorkommt (RAVINDRAN et al. 2023). Bei der transspermalen beziehungsweise sexuellen Übertragung sind die Spermatophoren des Männchens mit Pathogenen, wie beispielsweise Rickettsien, infiziert, und gehen während der Kopulation auf das Weibchen über (DEPLAZES et al. 2013). Eine besondere Form der Pathogenübertragung zwischen zwei Zecken ist das Co-feeding (Simultan-Infestation). Bei dieser Art der Übertragung hat der Wirt keine systemische Infektion und die Übertragung findet lediglich zwischen sehr nah nebeneinander blutsaugenden Zecken statt (DEPLAZES et al. 2013). Unter anderem bei Borrelien und dem FSME-Virus kann es zu dieser Form der Übertragung kommen (LABUDA et al. 1993, GERN und RAIS 1996).

2.1.5 Vektorfunktion von *Ixodes ricinus*

Ixodes ricinus fungiert als Vektor für eine Vielzahl von Pathogenen. Viele davon sind Zoonosen. Unter den viralen Pathogenen sind das FSME-Virus und das Louping-ill-Virus (LIV) zu nennen, beide gehören zu der Gruppe der Flaviviren. Das FSME-Virus ist von Ostasien (Japan) bis Westeuropa (Frankreich) verbreitet und löst neurologische Symptome unterschiedlichen Ausmaßes bei Menschen und teilweise auch bei Tieren aus (MANSFIELD et al. 2009, DOBLER et al. 2012). Das LIV findet sich in den Gebieten Großbritanniens und Irland und ist ebenfalls eine Zoonose mit neurologischen Symptomen. Während sie vor allem bei Schafen Symptome auslöst, kommt sie beim Menschen sehr selten vor (JEFFRIES et al. 2014).

Für eine Vielzahl von Bakterien fungiert *I. ricinus* als Vektor. *Anaplasma phagocytophilum* kommt in der nördlichen Hemisphäre in den gleichen Gebieten vor, in denen *Ixodes*-Zecken endemisch sind. Das Bakterium infiziert eine Reihe von Säugern wie Wiederkäuer, Pferde und Menschen. Die Symptome der Anaplasiose sind unspezifisch. Sie umschließen meistens fiebrige Zustände, Anorexie und zumindest bei Menschen ebenfalls weitere unspezifische grippeähnliche Symptome wie Muskel- und Kopfschmerzen (STUEN et al. 2013).

Zu der Bakteriengruppe *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) gehörende Spezies können die Lyme Borreliose auslösen. Die Lyme Borreliose ist durch ihren Vektor *Ixodes* spp. auf der gesamten Nordhalbkugel verbreitet und ist die relevanteste von Zecken übertragene Krankheit in diesem Gebiet. Sie manifestiert sich in unterschiedlichen Organen, wonach sich auch die Symptome stark unterscheiden können. Möglich sind kardiologische, dermatologische, arthrologische und neurologische Symptome (BOULANGER et al. 2019).

Die von *I. ricinus* übertragenen Arten von Rickettsien sind *Rickettsia helvetica* und *Rickettsia monacensis* (siehe auch Kapitel 2.3). *Rickettsia helvetica* kann bei Menschen unterschiedliche unspezifische Grippesymptome auslösen. *Rickettsia monacensis* löst selten eine Rickettsiose aus. Beide Rickettsienarten sind in Mitteleuropa vertreten (AZAGI et al. 2020).

Auch die Neoehrlichiose wird in Europa von *I. ricinus* übertragen. Sie wird durch das Bakterium *Neoehrlichia mikurensis* ausgelöst und ist eine eher seltene Erkrankung mit unspezifischen Symptomen, die Fieber und angiologische Erscheinungen einschließen. Besonders immunsupprimierte Personen sind betroffen (SILAGHI et al. 2016).

Die in Deutschland meldepflichtige schwere Erkrankung Tularämie ist eine Zoonose, welche Nagetiere und Hasenartige betrifft. Ein Stich durch Zecken ist nur einer der möglichen Infektionswege, welcher später auch den Krankheitsverlauf festlegt. Tularämie wird durch das Bakterium *Francisella tularensis* ausgelöst (KINGRY und PETERSEN 2014).

Die einzigen nennenswerten von *I. ricinus* übertragenen Parasiten sind die intraerythrozytären Babesien, die bei Menschen und Tieren die Babesiose auslösen können. Zu den von *I. ricinus* übertragenen Spezies zählen unter anderem *Babesia divergens*, *Babesia venatorum*, und *Babesia microti*. Symptome können Fieber und Ikterus mit Anämie sein (BOULANGER et al. 2019).

2.1.6 Vektorfunktion von *Dermacentor reticulatus*

Auch *D. reticulatus* spielt bei der Verbreitung vieler Pathogene eine tragende Rolle, unter ihnen das FSME-Virus, wiewohl noch nicht geklärt werden konnte, ob in gleichem Maße wie *I. ricinus* (SIDORENKO et al. 2021). Ebenfalls überträgt diese Zeckenart die beiden bakteriellen Erreger *Rickettsia slovaca* und *Rickettsia raoultii*, welche das Syndrom „SENLAT“ auslösen können (siehe auch Kapitel 2.3). Das Akronym steht im Englischen für „scalp eschars and neck lymphadenopathy after tick bite“, welches auch seine Symptome beschreibt (FOISSAC et al. 2013). Genauso wie *I. ricinus* überträgt *D. reticulatus* das Bakterium *F. tularensis* (BOULANGER et al. 2019).

Die beiden Parasiten *Theileria equi* und *Babesia caballi* lösen bei Pferden die Krankheit Equine Piroplasmose aus und werden in Europa unter anderem von *Dermacentor* spp. übertragen. Symptome beinhalten Ikterus, Ödeme an den Gliedmaßen und Fieber (ROCAFORT-FERRER et al. 2022). *Babesia canis* ist einer der Erreger der Kaninen Babesiose und löst bei Hunden unter anderem eine sehr schwere Thrombozytopenie und Anämie aus. Der einzellige Parasit ist vor allem im mediterranen Europa bis Süddeutschland verbreitet, wandert allerdings mit seinem Vektor *D. reticulatus* auch in nördlichere Gebiete (WEINGART et al. 2023).

2.2 Kleinsäuger

2.2.1 Taxonomie

Die Klasse der Säugetiere (Mammalia) umfasst derzeit 6544 dokumentierte noch erhaltene Arten, die meisten davon Kleinsäuger (UPHAM et al. 2023). Kleinsäuger umfassen mehrere Ordnungen. Davon sind Nagetiere (Rodentia) mit 2652 lebenden Arten die umfangreichste Ordnung, gefolgt von Fledertieren (Chiroptera) mit 1460 Arten, und Insektenfressern (Eulipothyphla) mit 569 Arten (UPHAM et al. 2023).

In der Ordnung der Nagetiere existieren in Deutschland 34 Arten (MEINIG et al. 2020). Die Gattungen *Apodemus* (Familie der Echten Mäuse (Muridae)), *Microtus* und *Clethrionomys* (beide zugehörig der Familie der Wühlmäuse (Cricetidae)) sind in dieser Ordnung die am häufigsten vorkommenden. In Deutschland vorkommende wichtige Vertreterinnen der Gattung *Apodemus* sind die Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*), die Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*) und die Brandmaus (*Apodemus agrarius*) (AULAGNIER et al. 2008). Von der Alpenwaldmaus (*Apodemus alpicola*) gibt es kaum Nachweise in Deutschland (MEINIG et al. 2020). Die einzige Art der in Deutschland vorkommenden *Clethrionomys* ist die Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*) (AULAGNIER et al. 2008). Mit über 20 Arten ist die Gattung der *Microtus* sehr umfangreich (AULAGNIER et al. 2008). In Deutschland kommen vier Arten vor: die Feldmaus (*Microtus arvalis*), die Erdmaus (*Microtus agrestis*), die Bayerische Kleinwühlmaus (*Microtus liechtensteini bavaricus*) und die Kleinwühlmaus (*Microtus subterraneus*) (MEINIG et al. 2020). Die einzige in Deutschland vertretene Art der Gattung *Arvicola* ist die Schermaus (*Arvicola amphibius*) (AULAGNIER et al. 2008).

In der Ordnung der Insektenfresser ist die Familie der Spitzmäuse (Soricidae) mit neun Arten in Deutschland vertreten (MEINIG et al. 2020). Die Gattung der *Sorex* umfasst 14 Arten, davon kommen 4 in Deutschland vor: die Alpenspitzmaus (*Sorex alpinus*), die Schabrackenspitzmaus

(*Sorex coronatus*), die Waldspitzmaus (*Sorex araneus*) und die Zwergspitzmaus (*Sorex minutus*) (AULAGNIER et al. 2008, MEINIG et al. 2020). Die Feldspitzmaus (*Crocidura leucodon*), die Gartenspitzmaus (*Crocidura suaveolens*) und die Hausspitzmaus (*Crocidura russula*) sind die einzigen in Deutschland vorkommenden Arten der ansonsten sehr umfangreichen Gattung *Crocidura* (AULAGNIER et al. 2008, MEINIG et al. 2020, HARING et al. 2023). Im Folgenden wird eine Auswahl von 10 in Deutschland vorkommenden Arten beschrieben, welche aus epidemiologischer Sicht für zoonotische Krankheitserreger von Bedeutung sind.

2.2.2 Wühlmäuse der Gattung *Microtus*

2.2.2.1 Habitat

Microtus arvalis kommt fast in ganz Europa vor (HAUER et al. 2009). Sie meidet geschlossene Wälder und findet sich vor allem in offenem Grasland, Acker und Waldrändern (VON BLANCKENHAGEN und STÄDTLER 2011). *Microtus agrestis* ist etwas größer als *M. arvalis* und findet sich in großen Teilen Nord- und Mitteleuropas und Asiens. In Süd- und Westeuropa handelt es sich bei Populationen vermutlich um kryptische Arten (AULAGNIER et al. 2008). Obwohl *M. agrestis* in verschiedenen Habitaten vorkommt, bevorzugt sie eine dichte Krautschicht (HAUER et al. 2009).

2.2.2.2 Rolle als Reservoir und Vektor von Zoonosen

Microtus spp. dient für verschiedene Bakterien als Reservoir und/oder Vektor. Diese Gattung gilt beispielsweise als Hauptreservoir und Vektor der Bakterien *Leptospira* spp., deren verschiedene Spezies sich teilweise stark in der Pathogenität unterscheiden (JESKE et al. 2021). Die sich möglicherweise manifestierende Zoonose heißt Leptospirose. Die Übertragung findet direkt über den Kleinsäuger oder über Kontakt durch infektiösen Urin in der Umgebung wie Wasser oder Untergrund statt. Es können milde Symptome entstehen, die der Grippe ähneln, bis hin zu schwerwiegenden Erkrankungen mit Fieber, Ikterus und multipler Organdysfunktion (SCHMIDT et al. 2021). Des Weiteren fungieren *Microtus* spp. als Reservoir für die Bakterien *B. burgdorferi* s.l. (KRÓL et al. 2022). *Microtus* spp. gelten außerdem als Reservoir für die Bakterien *Bartonella* spp., von denen manche Spezies die Zoonose Bartonellose auslösen (TOŁKACZ et al. 2018). Die Symptome sind je nach Erreger und Immunstatus der betroffenen Person vielfältig. Es kann unter Anderem zu Endokarditis und wiederkehrenden Fieberschüben kommen (LAMAS et al. 2008).

Bei der Betrachtung von zoonotisch relevanten Parasitosen spielt die Gattung *Microtus* vor allem als Reservoir für den intraerythrozytären Parasiten *B. microti* eine tragende Rolle (KARBOWIAK 2004). Außerdem sei der Fuchsbandwurm (*Echinococcus multilocularis*) genannt. Dieser befällt während seines Lebenszyklus verschiedene Kleinsäuger, vorzugsweise Wühlmäuse, als Zwischenwirte. Insbesondere *M. arvalis* scheint ein Hauptvektor der Fuchsbandwurmeier zu sein (ROMIG et al. 2017). Die Zoonose, die durch diesen Erreger ausgelöst wird, wird alveoläre Echinokokkose genannt. Die den Menschen als Fehlwirt infizierenden Fuchsbandwürmer lassen sich während ihres Lebenszyklus als Metazestoden in vorzugsweise Leber, auch Lunge, nieder. Anfangs sind diese sehr klein und die Wirte asymptomatisch. Die auf eine enorme Vergrößerung folgenden Symptome sind abhängig von der Größe der Zysten, welches Organsystem befallen ist, dem Aktivitätsstatus und der Zyste umgebende Organstrukturen (ECKERT und DEPLAZES 2004).

Außerdem ist *Microtus* spp. relevant bei der Übertragung einiger Viren. Das Tulavirus ist ein Hantavirus, welches hauptsächlich von *M. arvalis* übertragen wird. Molekularbiologische Nachweise des Tulavirus in erkrankten Personen gibt es nur in Einzelfällen. Mögliche Symptome sind insbesondere Fieber, Kopfschmerz und renale Dysfunktion (HOFMANN et al. 2021). Eines der Reservoirs des FSME-Virus stellt *Microtus* spp. dar (MICHELITSCH et al. 2019).

2.2.3 Die Wühlmäuse *Clethrionomys glareolus* und *Arvicola amphibius*

2.2.3.1 Habitat

Ein typischer Vertreter der Kleinsäuger des Waldes ist der Nager *Cl. glareolus*. Die Spezies bevorzugt Wälder mit üppigen Krautschichten (HAUER et al. 2009). Als Ubiquist besiedelt sie bei Fehlen anderer Wühlmäuse allerdings auch andere, vielfältige Lebensräume. Wenige Mäusearten sind ähnlich weit in Europa verbreitet wie die Rötelmaus (AULAGNIER et al. 2008). Die ebenfalls den Wühlmäusen zugehörige große Wühlmaus *A. amphibius* findet sich besonders in der Nähe von Flüssen oder stehendem Gewässer, ebenfalls in Dauergrünland (HAUER et al. 2009). Sie ist insbesondere in Zentral- und Osteuropa verbreitet (AULAGNIER et al. 2008).

2.2.3.2 Rolle als Reservoir und Vektor von Zoonosen

Für einige Bakterien mit zoonotischer Bedeutung spielt *Cl. glareolus* eine Rolle. Unter anderem dienen Individuen von *Cl. glareolus* als Reservoir für die Bakterien *B. burgdoferi* s.l. (PIESMAN und GERN 2004). Gleich *Apodemus* spp. wird auch *Cl. glareolus* von den Bakterien

Bartonella spp. und *A. phagocytophilum* als Reservoir genutzt (STUEN et al. 2013, OBIEGALA et al. 2021).

Außerdem fungiert die Rötelmaus als einer der Hauptvektoren für den Fuchsbandwurm (ROMIG et al. 2017). Die Rolle als Reservoir für den Parasit *B. microti* scheint untergeordnet (KARBOWIAK 2004).

Clethrionomys glareolus ist Vektor des zu den Hantaviren gehörenden Puumalavirus. Die Infektion erfolgt auf direktem oder indirektem Weg durch Kontakt mit den Tieren. Eine große Rolle bei der Übertragung nimmt hier die Bildung von Aerosolen mit infiziertem Kot oder Urin ein, welche von Menschen besonders während der landwirtschaftlichen Arbeit oder als Staub in ländlichen Gebäuden eingeatmet wird (LEBECQUE und DUPONT 2020). Das Puumalavirus kann eine milde Form des hämorrhagischen Fiebers mit renalem Syndrom auslösen, welches Nephropathia epidemica genannt wird. Es kann zu Fieber, Kopfschmerz, gastrointestinalen Symptomen, beeinträchtigter Nierenfunktion und eingeschränkten Visus kommen (VAPALAHTI et al. 2003). *Clethrionomys glareolus* gilt außerdem als Reservoir für das FSME-Virus (MICHELITSCH et al. 2019, BRANDENBURG et al. 2023)

Die Spezies *A. amphibius* ist nicht im selben Ausmaß verbreitet, weshalb auch über die Belastung mit Krankheitserregern weniger Daten vorliegen. Ihre Bedeutung scheint aufgrund dessen sehr gering.

2.2.4 Echte Mäuse der Gattung *Apodemus*

2.2.4.1 Habitat

Eine der in Europa am weitesten verbreitete *Apodemus* spp. ist *A. flavicollis* (AULAGNIER et al. 2008). Sie bewohnt hauptsächlich Waldgebiete. Insbesondere unterholzreiche Misch- und Laubwälder mit Altbaumbeständen sind bei dieser Spezies beliebt (HAUER et al. 2009). Eine weitere weit verbreitete Spezies dieser Gattung ist *A. sylvaticus*. Entgegen ihrem Namen zeigt sie keine exklusive Verbundenheit zu Waldgebieten, fühlt sich in verschiedenen Habitaten wohl und meidet sogar tiefe Wälder (AULAGNIER et al. 2008). Das Verbreitungsgebiet der Spezies *A. agrarius* erstreckt sich von Nord-/Ostdeutschland in den Osten bis Russland (AULAGNIER et al. 2008). Sie lebt in einer Vielzahl von Habitaten, bevorzugt allerdings eine gewisse Feuchtigkeit (HAUER et al. 2009).

2.2.4.2 Rolle als Reservoir und Vektor von Zoonosen

Apodemus spp. sind Reservoirwirte und/oder Vektoren für einige zoonotische Bakterien. Tiere der Gattung *Apodemus* fungieren wie *Microtus* spp. ebenfalls als Reservoir für Leptospiren (JESKE et al. 2021). Auch die Spirochäten *B. burgdorferi* s.l. nutzen *Apodemus* spp. als Reservoir (GERN et al. 1998). Durch Vektoren werden die Bakterien auf einen weiteren Wirt übertragen und können zum Beispiel die Lyme Borreliose auslösen (PIESMAN und GERN 2004). Vertreterinnen des Genus *Apodemus* dienen als Reservoir für die Bakterien *Bartonella* spp. von unterschiedlicher Pathogenität (OBIEGALA et al. 2021). Obwohl vor allem Großwildarten Reservoirwirte von *A. phagocytophilum* sind, gibt es auch viele Nachweise in Nagern wie *Apodemus* spp., die eine Reservoirfunktion dieser Familie nahelegen (STUEN et al. 2013).

Die Bedeutung von *Apodemus* spp. in zoonotischen Parasitosen scheint sehr gering. Daten über Infektionen mit dem Fuchsbandwurm sind rar und existieren lediglich über *A. agrarius*. Insgesamt scheint dieses Genus eine untergeordnete Rolle in dessen Lebenszyklus zu spielen (ROMIG et al. 2017). Auch als Reservoir für *B. microti* wird diesem Genus eine geringere Bedeutung beigemessen als dem Hauptreservoir *Microtus* spp. (KARBOWIAK 2004).

Auch einige Viren fallen in das Reservoir und/oder in den Vektorbereich der *Apodemus* spp.. Das Dobrava-Belgrad-Virus wird von *A. flavicollis* übertragen. Das Saaremaa-Virus wird von *A. agrarius* übertragen und wurde als humane Infektion nur in Einzelfällen serologisch nachgewiesen. Die Übertragung der Hantaviren erfolgt normalerweise durch Inhalation von Aerosolen mit infizierten Ausscheidungen der Kleinsäuger. Die Infektionen können subklinisch bis tödlich verlaufen. Klinisch kann sich die Infektion als hämorrhagisches Fieber mit renalem Syndrom darstellen (AVŠIČ-ŽUPANC et al. 2019). Eine weitere Reservoirfunktion nimmt insbesondere *A. flavicollis* in Europa für das FSME-Virus ein (MICHELITSCH et al. 2019).

2.2.5 Spitzmäuse: *Sorex* spp. und *Crocidura russula*

2.2.5.1 Habitat

Sorex araneus ist in Europa weit verbreitet. In Südwesteuropa findet sie sich allerdings ausschließlich in den Bergen (AULAGNIER et al. 2008). Sie ist vielen Habitaten tolerant gegenüber, solange eine ausreichende Feuchtigkeit vorhanden ist. Innenstädte und große Felder werden von dieser Spezies gemieden. Das Verbreitungsgebiet als auch das bevorzugte Habitat von *S. minutus* stimmt mit dem von *S. araneus* überein (HAUER et al. 2009). *Crocidura russula* besiedelt Südwesteuropa bis nördliche Teile Marokkos (AULAGNIER et al. 2008). Sie

fühlt sich in feuchteren Habitaten wohl, findet sich vermehrt in Siedlungen, beziehungsweise Siedlungsnähe, und meidet Wälder (AULAGNIER et al. 2008, HARING et al. 2023).

2.2.5.2 Rolle als Reservoir und Vektor von Zoonosen

Die Vertreterinnen von *Sorex* spp. finden in Studien häufig nicht so intensive Beachtung wie ihre sympatrischen Kleinsäuger. *Sorex araneus* und *S. minutus* werden als Reservoir für *B. burgdorferi* s.l. angesehen (GERN et al. 1998). Außerdem wurden *A. phagocytophilum* und *B. microti* in *S. araneus* nachgewiesen und könnte diesen Erregern als Reservoirwirt dienen (BOWN et al. 2011). Aufgrund der Ergebnisse verschiedener Studien werden *Sorex* spp. als mögliche Reservoirwirte für das Bakterium *Bartonella* spp. gehandelt (HOLMBERG et al. 2003, OBIEGALA et al. 2021).

Die Spitzmaus *C. russula* wird in Studien ebenfalls seltener betrachtet. Es existieren Nachweise von Leptospiren in dieser Spezies. Für die Übertragung vieler arthropodenübertragener Krankheitserreger wie Babesien, Anaplasmen und Bartonellen scheint die Bedeutung von *C. russula* verschwindend gering (HARING et al. 2023).

2.3 *Rickettsia* spp.

2.3.1 Taxonomie und Aufbau des Bakteriums

Rickettsia spp. (Ricketts, 1909) sind weltweit vorkommende gramnegative Bakterien der Klasse Alpha-Proteobacteria. Die der Ordnung der Rickettsiales angehörenden pleomorphen Rickettsien vermehren sich obligat intrazellulär (MERHEJ und RAOULT 2011). Historisch wurden Rickettsien aufgrund von immunologischen Kreuzreaktionen und Vektorspezies in drei Gruppen eingeteilt: Zeckenstichfieber-Gruppe (spotted fever group; SFG), Fleckfieber-Gruppe (typhus group; TG) und Tsutsugamushi-Fieber-Gruppe (scrub typhus group; STG) (MERHEJ und RAOULT 2011). Eine bis heute noch sehr verbreitete Einteilung beinhaltet vier Gruppen: SFG, TG, Ancestral-Gruppe (mit *Rickettsia bellii* und *Rickettsia canadensis*) und Transitional-Gruppe (*Rickettsia felis* und *Rickettsia akari*) (KIM 2022). Mittlerweile werden Rickettsien allerdings in die vier Gruppen SFG, TG, *R. bellii*-Gruppe und *R. canadensis*-Gruppe eingeteilt (MERHEJ und RAOULT 2011). Hier unterteilt sich die SFG nochmal in vier Gruppen: *Rickettsia rickettsii*-Gruppe (u.a. *R. rickettsii* spp., *R. slovacae*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia honei*), *Rickettsia massiliae*-Gruppe (u.a. *R. massiliae*, *Rickettsia rhipicephali*, *Rickettsia aschlimanii*, *R. raoultii*), *R. helvetica*-Gruppe (u.a. *R. helvetica*, *Rickettsia asiatica*, *R. monacensis*, *Rickettsia tamurae*) und *R. akari*-Gruppe

(*R. akari*, *Rickettsia australis*, *R. felis*). Die TG wird von *Rickettsia prowazekii* und *Rickettsia typhi* repräsentiert. *Rickettsia canadensis* ist die einzige Spezies der *R. canadensis*-Gruppe. In der *R. bellii*-Gruppe befindet sich *R. bellii* spp. und diverse *Rickettsia*-Symbionten von verschiedenen Insekten (z.B. Eulenfalter und Schnellkäfer) (MERHEJ und RAOULT 2011). Bei Rickettsien handelt es sich um kleine Bakterien, deren Genome eine Größe von 1,1-1,5 Mb (megabases) haben und etwa 900-1500 Gene beinhalten (MERHEJ und RAOULT 2011). Verschiedene Gene sind hier besonders interessant für die Labordiagnostik. Das für die Citrat-Synthase kodierende Gen (*gltA*) besitzen alle *Rickettsia* spp. Ebenfalls besitzen alle das kodierende Gen für das Oberflächenprotein „outer membrane protein B“ (*ompB*). Das kodierende Gen für das Oberflächenprotein „outer membrane protein A“ (*ompA*) fehlt in der TG, während es in der SFG alle Vertreterinnen besitzen (WÖLFEL et al. 2008). Ersteres (*ompB*) ist für die Adhäsion an die Wirtszelle nötig, letzteres (*ompA*) für die Invasion in diese (MERHEJ und RAOULT 2011).

2.3.2 Vektoren von Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe (SFG) und Übertragung auf den Wirt

Da Rickettsien obligat intrazellulär leben, sind sie in der Umwelt nicht lange überlebensfähig und sind auf Wirtszellen angewiesen. Durch Vektoren werden Rickettsien auf Wirte übertragen. Bei den Vektoren handelt es sich um unterschiedliche hämatophage Arthropoden wie Läuse, Flöhe, Zecken und andere Milben. Die Übertragung in den Wirtskörper findet durch infizierten Speichel oder infektiösen Kot statt (LAUKAITIS und MACALUSO 2021). Zecken infizieren den Wirt über die Speichelsekretion während des Blutmahls (AZAD und BEARD 1998). Fast die gesamte SFG wird von Zecken übertragen (MERHEJ und RAOULT 2011). Die einzigen Ausnahmen bilden *R. felis* und *R. akari*. Erstere Spezies wird von dem Katzenfloh (*Ctenocephalides felis*) übertragen, letztere hauptsächlich von der Hausmausmilbe (*Liponyssoides sanguineus*) (BROWN und MACALUSO 2016, AKRAM et al. 2023). Da die meisten Vertreterinnen der numerisch größten SFG von Zecken übertragen werden, bilden diese die Hauptvektoren der *Rickettsia* spp. (Abbildung 1) (MERHEJ und RAOULT 2011). Dabei haben verschiedene *Rickettsia* spp. Präferenzen für verschiedene Zeckenspezies.

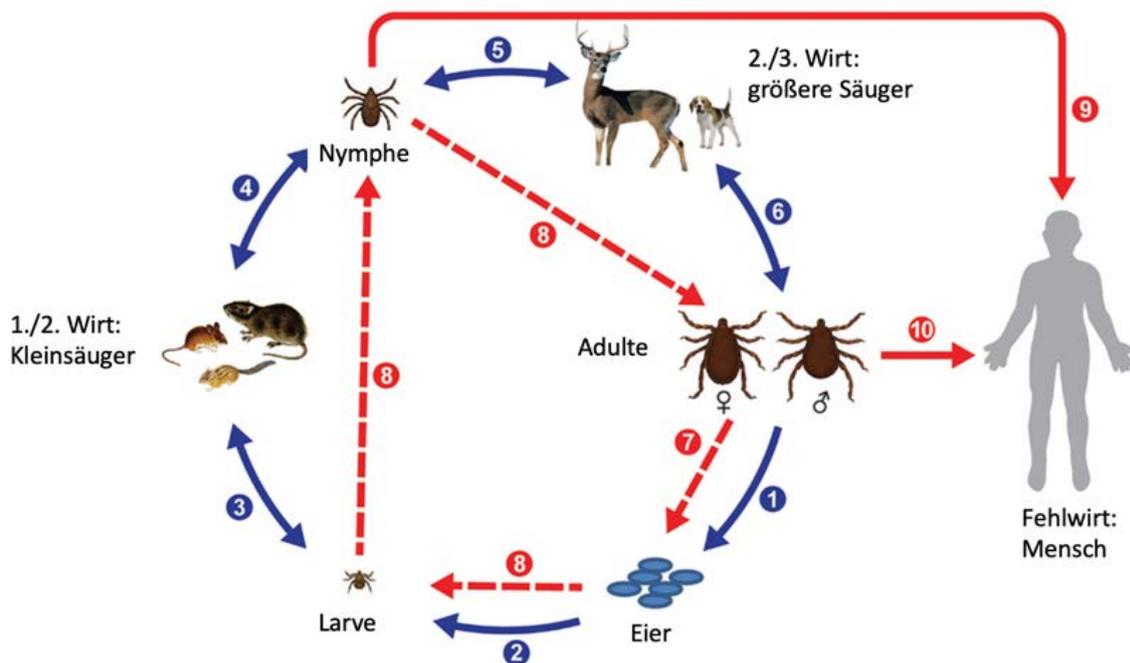


Abbildung 1: Transmission von zeckenübertragenen Rickettsien der SFG innerhalb des Lebenszyklus von Ixodidae modifiziert nach EREMEEVA und DASCH (2015) (EREMEEVA und DASCH 2015) 1) Oviposition des vollgesogenen Weibchens 2) Larven schlüpfen aus Eiern 3) Larve saugt Blut an Kleinsäugetieren 4) vollgesogene Larve häutet sich zur Nymphe 5) Nymphe saugt Blut an Kleinen oder Großen Säugern 6) Nymphe häutet sich zur adulten Zecke 7) Transovarielle Übertragung 8) Transstadiale Übertragung 9) Übertragung von Rickettsien auf den Menschen durch die Nymphe 10) Übertragung von Rickettsien auf den Menschen durch die adulte Zecke

2.3.3 Verbreitung von Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe in Deutschland, Europa, Welt

Da jede Rickettsienspezies eine Präferenz für bestimmte Vektoren hat, ist ihr Auftreten abhängig von der Verbreitung ihrer Vektoren und deren Wirten. Rickettsien wurden auf allen Kontinenten außer Antarktika festgestellt (Tabelle 1) (PAROLA et al. 2013).

2.3.3.1 Humanmedizinische Krankheitsbilder, Pathogenese, Bedeutung und Verbreitung der Erkrankungen in Deutschland, Diagnostik, und Therapie

Tabelle 1: Vektoren, Vorkommen und Symptome von verschiedenen Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe.

Pathogen	Hauptvektor ¹	Vorkommen ²	Krankheitsbezeichnung	Geläufige Symptome	Referenz
<i>R. africae</i>	<i>Amblyomma hebraeum</i> , <i>Amblyomma variegatum</i>	Südafrika (SA), Simbabwe ³	Afrikanisches Zeckenbissfieber - African tick bite fever (ATBF)	Fieber, Kopfschmerzen, Myalgie, Eschar	(MAZHETESE et al. 2021)
<i>R. akari</i>	Hausmausmilbe (<i>Liponyssoides sanguineus</i>)	Europa (Kroatien), Asien (Korea), Afrika (SA), Südamerika	Rickettsien-Pocken	Hautausschlag, Eschar	(AKRAM et al. 2023)
<i>R. australis</i>	<i>Ixodes holocyclus</i> , (<i>Ixodes tasmania</i>)	Australien	Queensland-Zeckenstichfieber – Queensland-Tick Typhus (QTT)	Fieber, Hautausschlag, Kopfschmerz, Myalgie	(STEWART et al. 2017)
<i>R. conorii</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Mittelmeerraum	Mittelmeer-Zeckenfleckfieber – Mediterranean spotted fever (MSF)	Fieber, Ausschlag, Petechien	(GUCCIONE et al. 2021)
<i>R. felis</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	Vereinigte Staaten von Amerika (USA), Frankreich, Brasilien, Senegal, Kenia, Deutschland, Thailand,...	Flohfleckfieber- Fleaborne spotted fever -	Fieber, Kopfschmerz, neurologische Symptome, Hautausschlag, Verdauungsstörungen	(BROWN und MACALUSO 2016) (PAROLA 2011)
<i>R. helvetica</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	Europa	Zeckenstichfieber	Fieber, Kopfschmerz, Myalgie	(PAROLA et al. 2013)

<i>R. japonica</i>	<i>Haemaphysalis flava</i> , <i>Haemaphysalis hystricis</i>	Asien (Japan, Südkorea, China)	Japanisches Fleckfieber - Japanese spotted fever	Fieber, Asthenie, Hautausschlag, Myalgie, Anorexie	(PAROLA et al. 2013) (LI et al. 2019)
<i>R. massiliae</i>	<i>R. sanguineus</i> , <i>Rhipicephalus guilhoni</i>	Sub-Sahara Afrika, Europa	-:-	Fieber, ähnlich MSF	(PAROLA et al. 2013)
<i>R. monacensis</i>	<i>I. ricinus</i>	Spanien, Italien	-:-	Fieber, grippeähnliche Symptome	(PAROLA et al. 2013)
<i>R. raoultii</i>	<i>D. reticulatus</i> <i>D. marginatus</i>	Europa	SENLAT ("Scalp eschars and neck lymphadenopathy after tick bites")	Kopfeschar, schmerzhaftes Adenopathien, Asthenia, Kopfschmerz	(PAROLA et al. 2013)
<i>R. rickettsii</i>	<i>Dermacentor andersoni</i> , <i>Dermacentor variabilis</i> , <i>R. sanguineus</i> , <i>Amblyomma cajennense</i>	USA, Mexiko, Brasilien, Kolumbien, Argentinien	Rocky-Mountain-Fleckfieber - Rocky Mountain spotted fever	Ikterus, neurologische Symptome, Atemnot, akute Niereninsuffizienz	(PAROLA et al. 2013)
<i>R. slovaca</i>	<i>D. marginatus</i> , <i>D. reticulatus</i>	Europa	SENLAT	siehe <i>R. raoultii</i>	(PAROLA et al. 2013)

¹ Die Liste der Vektoren ist nicht vollständig und beschreibt ausschließlich die Hauptvektoren.

² Auswahl von Regionen mit Nachweisen in Proben von Patient*innen.

³ Im Großteil der Fälle waren Reisende aus den USA und europäischen Ländern betroffen, bei denen erst nach Rückkehr in ihr Herkunftsland die Infektion nachgewiesen wurde.

Die Pathogenese gestaltet sich bei durch Rickettsien ausgelösten Erkrankungen gleich. Nachdem die Bakterien in den Wirtskörper eingedrungen sind, findet eine Invasion und Vermehrung in ihren Hauptzielzellen, den Endothelzellen statt. Außerdem findet dies auch in unterschiedlichem Ausmaß in Monozyten, Makrophagen, und Hepatozyten statt (MANSUETO et al. 2012). *Rickettsia* spp. bilden freie Radikale, Proteasen, und Phospholipasen und beeinträchtigen so die Endothelzellen (BOGDAN 2012). Aus der Schädigung der Endothelzellen von Gefäßen resultiert eine Vaskulitis, die erhöhte vaskuläre Permeabilität der kleinen und mittleren Blutgefäße in multiplen Organsystemen zur Folge hat. Mögliche

Effektorte sind beispielsweise Lunge, Herz, Haut, Zentrales Nervensystem, als auch Leber und Niere (GUCCIONE et al. 2021).

Die teilweise sehr schwerwiegenden Krankheiten, wie das Rocky-Mountain-Fleckfieber (*R. rickettsii*), Mittelmeer-Zeckenfleckfieber (*R. conorii*) oder Afrikanisches Zeckenbissfieber (*R. africae*) sind nicht autochthone Erkrankungen in Deutschland und wurden im Falle der Diagnose importiert (DOBLER und WÖLFEL 2009). In Deutschland vorkommende pathogene Rickettsien zeigen in der Regel keine schweren Verläufe. *Rickettsia raoultii* und *R. slovacca*, welche mit dem „SENLAT“-Syndrom (scalp eschars and neck lymphadenopathy after tick bite) in Verbindung gebracht werden, wurden in verschiedenen weiteren europäischen Ländern diagnostiziert. Das Akronym beschreibt die Symptome (PAROLA et al. 2009, RIEG et al. 2011). *Rickettsia helvetica* wurde in Patient*innen mit Symptomen wie Fieber und Kopfschmerz nachgewiesen, ebenso *R. monacensis* (AZAGI et al. 2020).

Durch ihre teilweise unspezifischen Symptome können Rickettsiosen leicht fehldiagnostiziert werden. Um das Risiko einer Exposition einschätzen zu können, ist eine eingehende Anamnese von besonderer Bedeutung. Der tatsächliche Nachweis kann mit Blut bzw. Serum oder einer Biopsie erfolgen. Eingesetzt werden hierbei unter anderem serologische und molekularbiologische Nachweis- und kulturelle Anzuchtverfahren (ABDAD et al. 2018).

Für alle Rickettsiosen ist die Standardtherapie eine Behandlung mit Doxycyclin aus der Klasse der Tetracycline (DOBLER und WÖLFEL 2009). Bei Kontraindikation von Doxycyclin kann bei Rickettsiosen mit leichtem Verlauf auf andere Antibiotika wie Chloramphenicol und Fluorchinolone ausgewichen werden (BLANTON 2019).

2.3.3.2 Veterinärmedizinische Bedeutung

In der Veterinärmedizin spielen die Bakterien des Genus *Rickettsia* eine stark untergeordnete Rolle. *Rickettsia conorii* kommt gelegentlich bei Hunden vor. In Deutschland handelt es sich hierbei allerdings meist um eine im mediterranen Ausland erworbene Infektion. Die Hunde können unter Anämie, Thrombozytopenie und Fieber leiden (GUCCIONE et al. 2021). In den USA wurden Fälle von milden bis moderaten Erkrankungen bei Hunden mit *R. massiliae* in Verbindung gebracht (PAROLA et al. 2013). *Rickettsia rickettsii* ist pathogen in Hunden und kann wie beim Menschen ebenfalls das Rocky-Mountain-Fleckfieber auslösen (PAROLA et al. 2013).

3 Publikation

Spotted Fever Group Rickettsiae in Ticks and Small Mammals from Grassland and Forest Habitats in Central Germany

Charlotte Arz¹, Nina Król¹, Christian Imholt², Kathrin Jeske³, Zaida Rentería-Solís⁴, Rainer G. Ulrich³, Jens Jacob², Martin Pfeffer¹, Anna Obiegala¹

¹ Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany

² Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Julius Kühn-Institute, Topphaideweg 88, 48161 Münster, Germany

³ Institute of Novel and Emerging Infectious Diseases, Friedrich-Loeffler-Institut, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Germany

⁴ Institute for Parasitology, Centre for Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 35, 04103 Leipzig, Germany

MDPI, *Pathogens* **2023**, 12, 933. DOI: 10.3390/pathogens12070933

Stellungnahme zum Eigenanteil der Publikation

Das Konzept der Studie wurde von NK, CI, RGU, JJ, MP, und AO entworfen. Die Zecken wurden von NK und AO gesammelt. Die Kleinsäugerfänge wurden von CI und KJ vollzogen. Die Identifizierung des Lebensstadiums und Speziesbestimmung der Zecken erfolgte durch NK und mich. Die labordiagnostischen Untersuchungen (DNA-Extraktion, Real-Time PCR, konventionelle PCR, Gelelektrophorese, Aufreinigung der PCR-Produkte) der Kleinsäugerproben und Zecken auf Rickettsien habe ich nach Einweisung durch NK und AO eigenständig durchgeführt. Die statistische Datenanalyse erfolgte durch CI, AO, und mich. Die Literaturrecherche habe ich selbstständig vorgenommen und das Manuskript erstellt. Alle genannten Koautor*innen haben das Manuskript Korrektur gelesen und die finale Version nach der Revision des Manuskripts im Peer Review Verfahren akzeptiert.

Article

Spotted Fever Group Rickettsiae in Ticks and Small Mammals from Grassland and Forest Habitats in Central Germany

Charlotte Arz¹, Nina Król¹, Christian Imholt², Kathrin Jeske³, Zaida Rentería-Solis⁴, Rainer G. Ulrich³, Jens Jacob², Martin Pfeffer¹ and Anna Obiegala^{1,*}

¹ Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany; carz@studserv.uni-leipzig.de (C.A.); nina.krol@vetmed.uni-leipzig.de (N.K.); pfeffer@vetmed.uni-leipzig.de (M.P.)

² Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Julius Kühn-Institute, Toppleideweg 88, 48161 Münster, Germany; christian.imholt@julius-kuehn.de (C.I.); jens.jacob@julius-kuehn.de (J.J.)

³ Institute of Novel and Emerging Infectious Diseases, Friedrich-Loeffler-Institut, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Germany; kathrin.jeske@gmx.de (K.J.); rainer.ulrich@fli.de (R.G.U.)

⁴ Institute for Parasitology, Centre for Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 35, 04103 Leipzig, Germany; zaida_melina.renteria_solis@uni-leipzig.de

* Correspondence: anna.obiegala@vetmed.uni-leipzig.de

Abstract: Rickettsiae of the spotted fever group (SFG) are zoonotic tick-borne pathogens. Small mammals are important hosts for the immature life stages of two of the most common tick species in Europe, *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*. These hosts and vectors can be found in diverse habitats with different vegetation types like grasslands and forests. To investigate the influence of environmental and individual factors on *Rickettsia* prevalence, this study aimed to analyse the prevalence of SFG rickettsiae in ticks and small mammals in different small-scale habitats in central Germany for the first time. Small mammals of ten species and ticks of two species were collected from grasslands and forests in the Hainich-Dün region, central Germany. After species identification, DNA samples from 1098 ticks and ear snips of 1167 small mammals were screened for *Rickettsia* DNA by qPCR targeting the *gltA* gene. Positive samples were retested by conventional PCR targeting the *ompB* gene and sequencing. *Rickettsia* DNA was detected in eight out of ten small mammal species. Small mammal hosts from forests (14.0%) were significantly more often infected than those from grasslands (4.4%) ($p < 0.001$). The highest prevalence was found in the mostly forest-inhabiting genus *Apodemus* (14.8%) and the lowest in *Microtus* (6.6%), which inhabits grasslands. The prevalence was higher in *D. reticulatus* (46.3%) than in the *I. ricinus* complex (8.6%). Adult ticks were more often infected than nymphs ($p = 0.0199$). All sequenced rickettsiae in *I. ricinus* complex ticks were *R. helvetica*, and the ones in *D. reticulatus* were *R. raoultii*. Unlike adults, questing nymphs have had only one blood meal, which explains the higher prevalence in *I. ricinus* adults. Interestingly, habitat type did influence infection probability in small mammals, but did not in ticks. A possible explanation may be the high prevalence in *Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus* which were more abundant in the forest.

Keywords: *Ixodes*; *Dermacentor*; *Apodemus*; *Sorex*; *Microtus*; *Clethrionomys*; season; life stage; ecotone; *Borrelia*

Citation: Arz, C.; Król, N.; Imholt, C.; Jeske, K.; Rentería-Solis, Z.; Ulrich, R.G.; Jacob, J.; Pfeffer, M.; Obiegala, A. Spotted Fever Group Rickettsiae in Ticks and Small Mammals from Grassland and Forest Habitats in Central Germany. *Pathogens* **2023**, *12*, 933. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070933>

Academic Editors: Borawski Karol and Anna Moniuszko-Malinowska

Received: 25 April 2023

Revised: 5 July 2023

Accepted: 7 July 2023

Published: 12 July 2023



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

1. Introduction

Hard ticks are haematophagous arthropods that can be found in diverse habitats with different kinds of vegetation. While feeding, they may serve as vectors for multiple tick-borne pathogens (TBPs) like protozoan parasites, bacteria, and viruses. The most common tick species in central Europe is the castor bean tick *Ixodes ricinus* [1]. It can be found in various environments, from forests over grasslands to urban areas [2]. As three-

host non-nidicolous ectoparasites, immature *I. ricinus* ticks (larvae and nymphs) feed on small and medium-sized mammals, birds, and reptiles, while adult ticks rather feed on larger mammals such as roe deer (*Capreolus capreolus*) and wild boar (*Sus scrofa*) [3]. The geographical movement of the hosts is essential for the distribution of ticks and their carried pathogens [4]. The ornate dog tick, *Dermacentor reticulatus*, is also a commonly found tick species in Germany and is linked to many TBP's [1]. Its immature life stages are nidicolous and feed on small mammals, while non-nidicolous adults usually feed on larger mammals [5].

In general, small mammals act as reservoirs for many vector-borne pathogens such as tick-borne alpha proteobacteria belonging to the order Rickettsiales or spirochaetes from genus *Borrelia* [6]. Thus, the composition of the natural habitat plays an important role in the occurrence and diversity of small mammal species [7], and in turn, may have an impact on the occurrence and density of hard ticks and their TBP's [8].

Rickettsia spp. are obligate intracellular bacteria and can be divided into four groups: the spotted fever group (SFG), the typhus group (TG), the *R. canadensis* group, and the *R. bellii* group [9]. Rickettsiae have been detected on all continents except Antarctica [9] and are mostly transmitted to mammals, including humans, reptiles, and birds, by haematophagous arthropods like fleas, lice, ticks, and other mites through blood meals or contaminated faeces [10]. Forming the most numerous group within the genus, the SFG is the most widespread in Europe and almost exclusively tick-borne, with only two exceptions: *R. felis* and *R. acari* [11]. *Rickettsia* spp. transmission between ticks has been confirmed for transstadial, sexual, and transovarial pathways, and also, but rather rarely, through co-feeding of *I. ricinus* ticks [12–15]. Even though different transmission paths exist within a population of ticks, reservoir hosts seem to play an important role in maintaining the life cycle and distribution of the bacteria as well. DNA of *R. helvetica* was detected in roe deer and wild boar, and therefore these mammal species are handled as potential reservoir hosts [16]; however, small mammals are assumed to be the main reservoir hosts [17].

Both *R. helvetica* and *R. monacensis* are part of the SFG and are associated with *I. ricinus*. *Rickettsia helvetica* is the most commonly found *Rickettsia* species in Germany [18–21] and is considered pathogenic due to multiple reports of clinical symptoms like fever, headaches, and myalgia in connection with *R. helvetica* infections in humans [9,22]. *Rickettsia monacensis* may rarely cause a rickettsiosis [23].

Rickettsia raoultii, also part of the SFG, is usually found in *D. reticulatus* and *D. marginatus* and has been detected in small mammals as well [20]. This species is associated with a syndrome called “SENLAT”, which stands for scalp eschars and neck lymphadenopathy after tick bite [1,9,24]. The syndrome has been diagnosed in various countries across Europe, including Germany; however, not in all cases *R. raoultii* has been confirmed as the causative agent [24–26]. Likewise, *R. slovaca* may cause these symptoms and is transmitted by the same vectors [27]. Studies on co-infections of *Rickettsia* spp. and *Borrelia* spp.—causing the most common tick-borne disease in Europe, Lyme disease—in ticks and especially in small mammals are rare [28]. *Rickettsia* spp. prevalence in ticks has been analysed earlier regarding different factors like season, tick life stage, and multiple landscape factors [29–31]. However, observations of *Rickettsia* prevalence in ticks, including other demographic factors such as habitat and small mammal species composition, plus *Rickettsia* prevalence in small mammals in the context of habitat structure are scarce in Europe. To fill these knowledge gaps, in this study, we (1) analysed questing ticks and small mammals at differently structured study sites around the Hainich-Dün National Park in central Germany, (2) investigated their SFG *Rickettsia* prevalence, (3) identified the *Rickettsia* species, (4) analysed co-infection rates of *Rickettsia* spp. and *Borrelia* spp. in ticks and small mammals, and (5) investigated the influence of environmental and individual host and vector factors like habitat, species of small mammals and ticks, ticks' life stage, and season on *Rickettsia* prevalence.

2. Materials and Methods

2.1. Study Sites, Sample Collection, and DNA Extraction

2.1.1. Study Sites

In total, 21 study sites surrounding the Hainich-Dün National Park in Thuringia, central Germany were examined. The area is one of the largest continuous deciduous forests in Germany, with European beech (*Fagus sylvatica*) being the dominant tree species. The region is characterised by forest and agricultural areas which are cultivated to different extents. While some forests and grasslands are extensively managed, the forests of the National Park itself are protected (<https://www.biodiversity-exploratories.de/en/regions/hainich-duen/>, accessed on 25 April 2023). A more detailed description of the study area was given in Król et al. [32].

2.1.2. Tick Collection

A total of 1115 questing ticks were collected for a previous study by flagging 100 m² simultaneously with small mammal trapping at 17 of the 21 sites, once per season (spring, summer, and autumn) in 2018 and 2019 [32] (Figure A1). The study sites for ticks were composed of one plot in the forest and one in the bordering grassland–forest ecotone, as described before [32]. Collected ticks were specified for sex, life stage, and species under a light microscope (Motic® SMZ-171, Moticeurope, S.L.U., Barcelona, Spain) according to taxonomic keys [33,34]. DNA was extracted using a QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer’s instructions for DNA isolation. Extracted DNA of 1094 ticks was available from the study of Król et al., where further details of tick handling, taxonomic identification, and DNA extraction procedure are described [32]. In addition to the given dataset, four ticks (three nymphs and one female of *I. ricinus*) that were all collected in spring 2019 were processed after the same protocol. Seventeen individuals (four *I. ricinus* nymphs and thirteen *D. reticulatus* adults) had to be excluded from further molecular biological analyses due to insufficient material conservation. Data on *I. ricinus* and *I. inopinatus* (presumably 16 individuals) were merged under the terminus “*I. ricinus* complex” [35].

In total, 1115 ticks belonging to 2 species were collected (Table A1). The most prevalent species was the *I. ricinus* complex (91.7%), followed by *D. reticulatus* (8.3%). The most frequently found life stages were the nymphs of the *I. ricinus* complex (74.9%). Most ticks were flagged in spring (74.1%) in comparison to summer (18.3%) and autumn (7.6%). In ecotones less ticks (35.2%) were flagged than in forests (64.8%). After excluding the above-mentioned ticks, 1018 ticks of the *I. ricinus* complex and 80 individuals of *D. reticulatus* were further processed (Table 1).

2.1.3. Small Mammal Collection

Extracted DNA derived from small mammal skin samples was available from a former study [32]. The samples were taken from about 0.5 × 0.5 cm ear tissue. DNA extraction was performed using the same methodology as for the ticks. Small mammals were trapped at 21 study sites, each in a paired system of a forest plot and an adjacent grassland plot per site [32] (Figure A1).

Snap trapping of small mammals took place in spring, summer, and autumn in 2017–2019. Trapping procedures, dissections, and further processing of samples have been published elsewhere [36,37]. For the current study, 1167 DNA samples that were randomly picked from 1945 individuals were available from summer 2017 and spring and summer 2018 and 2019 [32]. Extracted DNA belonged to 10 small mammal species of the families Soricidae, Cricetidae, and Muridae. The species collected most often was the common vole (*Microtus arvalis*) ($n = 407$; 34.9%), followed by the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) ($n = 278$; 23.8%), the yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*) ($n = 240$; 20.6%), the long-tailed field or wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) ($n = 108$; 9.3%), and the striped field mouse (*Apodemus agrarius*) ($n = 90$; 7.7%). Individuals belonging to the following

species were rather occasionally captured (all ≤ 20 individuals): the common shrew (*Sorex araneus*), the field vole (*Microtus agrestis*), the European water vole (*Arvicola amphibius*), the Eurasian pygmy shrew (*Sorex minutus*), and the greater white-toothed shrew (*Crocidura russula*) [32] (Table 2).

2.2. Real-Time PCR, Conventional PCR and Sequencing

Quantitative real-time PCR (qPCR) was used to screen all tick and small mammal samples for a 70 base pair (bp)-sized region of the citrate synthase gene (*gltA*) of *Rickettsia* spp. The mix was prepared as described previously [38] using the LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The cycling protocol for the Thermocycler (Stratagene Mx3000P, Agilent, Santa Clara, CA, USA) included 95 °C for 10 min followed by 45 cycles of denaturation at 95 °C for 25 s, annealing at 55 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s.

Tick samples tested with a cycle threshold (ct) < 36 and small mammal samples tested with a ct < 35 were subsequently examined by conventional PCR targeting a fragment of the gene encoding for the outer membrane protein B (*ompB*, 811bp) of the SFG rickettsiae. A previously described protocol [39] was followed with the primers “120–2788” and “120–3599” with one adjustment of the initial denaturation temperature of 94 °C.

For visualisation of the PCR products, gel electrophoresis was performed—8 μ L of the samples were mixed with 2 μ L of loading dye (TriTrack DNA Loading Dye (6 \times), Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) and separated on a 1.5% agarose gel.

PCR products were prepared for sequencing using the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) according to the protocol recommended by the manufacturer. Sequencing was performed commercially by Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg, Germany). After editing and aligning the sequences with Bionumerics (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium), a comparison was conducted to sequences present in GenBank on the Basic Local Alignment Tool (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, accessed on 9 March 2023). Two obtained sequences from small mammals and 49 obtained sequences from ticks from 2019 were submitted to GenBank under the accession numbers OQ694692–OQ694742.

2.3. Statistical Analysis

For *Rickettsia* spp. prevalence of ticks and small mammals, a confidence interval (95% CI) was formulated using the Clopper and Pearson method with Graph Pad software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). For small mammals, a generalised linear mixed model (GLMM) with binomial error distribution was computed with R software (version 4.1.2 for Windows; RStudio, Boston, MA, USA) and the *lme4* package. It was used to investigate the dependence of individual *Rickettsia* infection status (dependent binary variable; *Rickettsia* spp. positive = 1; *Rickettsia* spp. negative = 0) in relation to season (independent binary variable: summer vs. spring), habitat (independent binary variable: forest vs. grassland), and small mammal species (independent categorical variable) [40]. Because of low numbers of trapped individuals, the following five species were excluded from GLMM analysis: *M. agrestis*, *A. amphibius*, *S. araneus*, *S. minutus*, and *C. russula*.

In addition, GLMMs were generated for *A. flavicollis*, *Cl. glareolus*, and *M. arvalis* separately. Independent variables were sex of the individual (independent binary variable: female vs. male), habitat (see above), and season (see above).

For ticks, a slightly different model was calculated. The dependent variable was the binominal “presence of *Rickettsia*”. The independent variables were (i) developmental stage (binary: adult vs. nymph), (ii) habitat (binary: forest vs. ecotone), (iii) season (three stages: autumn, spring, and summer), and (iv) tick species (binary: *I. ricinus* complex vs. *D. reticulatus*). The first three independent variables were used for a model with exclusively *I. ricinus* complex ticks. Due to the low number of individuals collected, the model was not carried out for *D. reticulatus* ticks.

The interaction term for the GLMM included three and four independent variables with at least two levels each for small mammals and *I. ricinus* complex ticks, and ticks, respectively. To state potential differences of all variables separately, marginal means accessing the *emmeans* package within R and a post hoc test were computed. The significance threshold for *p* was set at ≤ 0.05 .

2.4. Co-Infections of *Borrelia* spp. and *Rickettsia* spp. in Ticks and Small Mammals

Results of detection of *Borrelia* spp. DNA in small mammals (1167 individuals) and tick samples (1094 individuals) that were also investigated in this study have been published in an earlier study [32]. In the current study, co-infections of *Borrelia* spp. (previous study) with *Rickettsia* spp. (current study) were analysed. To investigate the degree of co-occurrence, the approach proposed by Malini et al. was applied [41]. Here, the R package *CooccurrenceAffinity* was applied to calculate a maximum likely estimator to evaluate whether or not the pairing of *Rickettsia* spp. and *Borrelia* spp. was more or less likely than the expected prevalence [42]. Seasonal analyses were made for ticks and small mammals separately, and all trapped individuals regardless of species were taken into account.

3. Results

3.1. *Rickettsia* spp. Detection in Ticks

Positively tested individuals were from both the *I. ricinus* complex and *D. reticulatus* (Table 1). Samples of *D. reticulatus* ($n = 37$; 46.3%; 95% CI: 35.0–57.8) were significantly more often infected than *I. ricinus* complex samples ($n = 88$; 8.6%; 95% CI: 7.0–10.5) ($p < 0.001$) (Table A2). Per tick species, females had the highest prevalence (21.1%; 95% CI: 12.5–32.0 in *I. ricinus* complex and 52.9%; 95% CI: 38.5–67.1 in *D. reticulatus*), followed by males (8.1%; 95% CI: 3.8–14.8 in *I. ricinus* complex and 34.5%; 95% CI: 17.9–54.3 in *D. reticulatus*) and nymphs (7.6%; 95% CI: 5.9–9.6). Consequently, adults were significantly more often carriers of *Rickettsia* DNA than immatures, overall ($p = 0.02$) and regarding only the *I. ricinus* complex ($p = 0.005$). The prevalence in the forest (8.8%; 63/720; 95% CI: 6.79–11.06) was similar to the ecotone (16.4%; 62/378; 95% CI: 12.8–20.5) ($p = 0.711$). In spring the prevalence was the highest with 12.5% (103/826; 95% CI: 10.3–14.9), followed by summer with 9.4% (19/203; 95% CI: 5.7–14.2) and autumn with 4.3% (3/69; 95% CI: 0.9–12.2). Ticks in spring and summer were both more often infected than in autumn (spring: $p < 0.001$; summer: $p < 0.001$) (Table A2).

Table 1. *Rickettsia* spp. prevalence in ticks tested per habitat.

Tick Species	No. of Individuals in Ecotone	No. of Individuals in Forest	Total No. of Positive Individuals/Total (%)
	Positive/Total (%)	Positive/Total (%)	
<i>Ixodes ricinus</i> complex ¹	28/304 (9.2)	60/714 (8.4)	88/1018 (8.6)
<i>Dermacentor reticulatus</i>	34/74 (45.3)	3/6 (50.0)	37/80 (46.3)
Total	62/378 (16.4)	63/720 (8.8)	125/1098 (11.4)

No.: number. ¹ *Ixodes ricinus* and *Ixodes inopinatus*.

Out of all qPCR-tested ticks, 125 yielded a ct-value < 36 , 87 were positive in conventional PCR, and 86 could be sequenced and identified as *R. helvetica* (86.0%; $n = 74$, all *I. ricinus* complex) and *R. raoultii* (14.0%; $n = 12$, all *D. reticulatus*) (Table 3). Most *Rickettsia*-positive *I. ricinus* complex samples showed 99.5–100% identity with the same accession number as the small mammal samples (see below) [43]. One sample from *I. ricinus* was 100% identical to *R. helvetica* isolate Komi (GenBank accession number: KP866151), sequenced from *Ixodes persulcatus* ticks from the Komi Republic in Russia [44]. Most rickettsiae of *D. reticulatus* ticks showed 99.9–100% identity with *R. raoultii* Xinjiang-CP13RP (GenBank accession number: MG811717) from China. One *D. reticulatus* tick-derived *Rickettsia* sequence was 99.9% identical to the *R. raoultii* clone ALSK081 (GenBank

accession number KU723537) from Xinjiang, China, and two were 99.9% and 100% identical to the *R. raoultii* isolate Xinjiang-JMN (GenBank accession number: MF002526) from China.

3.2. *Rickettsia* spp. Detection in Small Mammals

Rickettsia spp. DNA was detected in 8 out of 10 small mammal species (*A. flavicollis*, $n = 37$; *M. arvalis*, $n = 26$; *A. sylvaticus*, $n = 20$; *Cl. glareolus*, $n = 19$; *A. agrarius*, $n = 8$; *S. araneus*, $n = 2$; and *M. agrestis*, $n = 2$; *S. minutus*, $n = 1$) (Table 2).

In summer (10.2%; $n = 102$; 95% CI: 8.4–12.3) prevalence was similar to spring (7.7%; $n = 13$; 95% CI: 4.2–12.9) ($p = 0.106$). Individuals from forests ($n = 93$; 14.0%; 95% CI: 11.5–16.9) were more often infected than individuals from grassland ($n = 22$; 4.4%; 95% CI: 2.7–6.5) ($p < 0.001$). *Apodemus sylvaticus* had the highest prevalence of 18.5% ($n = 20$; 95% CI: 11.7–27.1).

The GLMM with the factors of season and habitat (Table A3) revealed statistical significance for the lower probability of infection of an individual of *Cl. glareolus* compared to *A. agrarius* ($p = 0.034$). No statistical significance was observed when only the two species were compared and no other factors were taken into account ($p = 0.206$). *Clethrionomys glareolus* was less often infected with *Rickettsia* spp. than both *A. flavicollis* ($p = 0.007$) and *A. sylvaticus* ($p < 0.001$).

In the GLMMs computed individually for the three most abundant species, sex and season did not influence the prevalence in *M. arvalis*, *Cl. glareolus* and *A. flavicollis* (Table A3). Out of these three species, habitat mattered only for *M. arvalis*. The prevalence was higher in forests, but 92.6% of the animals of that species were trapped in grasslands ($p < 0.001$) (Table 2).

Although excluded from the analysis with GLMM, this is the first detection of *Rickettsia* spp. DNA in *S. minutus* in Germany to our knowledge.

Table 2. *Rickettsia* prevalence in small mammal individuals per species, per habitat, and in total.

Small Mammal Species	No. of Individuals in Grassland Positive/Total (%)	No. of Individuals in Forest Positive/Total (%)	Total No. of Positive Individuals/Total (%)
<i>Microtus arvalis</i>	19/377 (5.0)	7/30 (23.3)	26/407 (6.4)
<i>Clethrionomys glareolus</i>	1/8 (12.5)	18/270 (6.7)	19/278 (6.8)
<i>Apodemus flavicollis</i>	0/20 (0)	37/220 (16.8)	37/240 (15.4)
<i>Apodemus sylvaticus</i>	1/28 (3.6)	19/80 (23.8)	20/108 (18.5)
<i>Apodemus agrarius</i>	1/46 (2.2)	7/44 (15.9)	8/90 (8.9)
<i>Sorex araneus</i>	0/11 (0)	2/9 (22.2)	2/20 (10.0)
<i>Microtus agrestis</i>	0/8 (0)	2/7 (28.6)	2/15 (13.3)
<i>Arvicola amphibius</i>	0/3 (0)	0/1 (0)	0/4 (0)
<i>Sorex minutus</i>	0/2 (0)	1/2 (50.0)	1/4 (25.0)
<i>Crocidura russula</i>	0/1 (0)	0	0/1 (0)
Total	22/504 (4.4)	93/663 (14.0)	115/1167 (9.9)

No.: Number.

Of the 115 individuals that were tested positive in qPCR, 24 yielded a ct-value <35. Only two of them (both *A. flavicollis*) yielded a result in the *ompB* gene. Both amplicons could be sequenced and were 100% identical to *R. helvetica* strain AS819 (deposited in GenBank: MF163037), which was isolated from an *I. ricinus* tick [43] (Table 3).

Table 3. Sequencing results of PCR products of the *ompB* gene in ticks and small mammal samples.

Habitat	Host Species	Sex /Life Stage	<i>Rickettsia</i> Species	Study Site ¹	No. of Individuals	Maximal Identity (%)	GenBank ID
ecotone	<i>Ixodes ricinus</i>	F	<i>Rickettsia helvetica</i>	S17	1	100	MF163037
					1	99.9	
				S16	1	100	
				S7	1	100	
				S8	1	99.9	
				S12	1	100	
				S9	1	100	
		M		S5	1	100	
				S16	1	100	
				S9	1	100	
		N		S5	1	100	
				S10	1	100	
					1	99.9	
					1	100	
				S9	1	99.75	
					1	100	
					1	100	
	S7	1	99.9				
		1	100				
	S5	2	100				
	<i>Dermacentor reticulatus</i>	F	<i>Rickettsia raoultii</i>		1	99.9	KU723537
					5	99.9	MG811717
				3	100		
		M			1	99.9	MF002526
					1	99.8	MF163037
forest	<i>I. ricinus</i>	F	<i>R. helvetica</i>		1	100	MF163037
					1	100	
				S8	1	100	
				S3	1	99.5	
				S14	1	100	
		M		S9	1	99.8	
					2	100	
				S3	1	100	
		N		S14	1	100	
					1	98	
				S12	1	99.9	
					1	100	
				S10	1	99.8	
				S9	3	99.8	
					15	100	
	S7	1	100				
	S8	3	100				
	S5	2	100				
	S3	1	99.7				
		9	100				

				1	99.9		
			S15	1	100		
			S13	1	100		
			S6	1	100		
	<i>D. reticulatus</i>	F	<i>R. raoultii</i>	S2	1	100	MF002526
		M		S3	1	99.9	MG811717
forest	<i>Apodemus flavicollis</i>	na	<i>R. helvetica</i>	S15	1	100	MF163037
				S13	1	100	

No.: Number; ID: Identification; F: Female; M: Male; N: Nymph; and na: not available. ¹ Map of study sites with *Rickettsia* positive samples is available in Appendix (Figure A1).

3.3. Co-Infection with *Rickettsia* spp. and *Borrelia* spp. in Ticks and Small Mammals

In nine ticks, both *Rickettsia* DNA and *Borrelia* DNA were detected (9/1094; 0.8%). All sample derived from the *I. ricinus* complex (9/1014; 0.9%). The only *Rickettsia* spp. detected was *R. helvetica*. *Borrelia valaisiana* and *Borrelia afzelii* were detected in two samples each. In five tick samples, *Borrelia* species could not be determined (Table A4). In small mammals, DNA of both bacteria were also found in nine samples (9/1167; 0.8%). Co-infections were detected in *M. arvalis* ($n = 3$; 0.7%), *Cl. glareolus* ($n = 3$; 1.1%), *S. araneus* ($n = 2$; 10.0%), and *A. flavicollis* ($n = 1$; 0.4%). No PCR products of small mammal samples could be analysed to the species level of *Rickettsia* spp. and *Borrelia* spp. (Table A5) [32].

Co-occurrence analysis revealed that *Rickettsia* spp. prevalence in ticks from spring had a slightly negative tendency with *Borrelia* spp. occurrence (Alpha MLE: -0.72, Blaker CI (-1.60–0.004), $p = 0.06$). In all other scenarios, no co-occurrence trends were observed (Table A6).

4. Discussion

Rickettsiae of the SFG are pathogens of public health concern. Studies, including analyses of *Rickettsia* prevalence in both ticks and small mammal hosts regarding various aspects, like particular habitats and the possible influence on each other, are largely overlooked. This study presents, for the first time, data on *Rickettsia* species and their prevalence in ticks and small mammals in central Germany with different habitat features.

In the current study, the most prevalent tick species was *Ixodes ricinus*, which is the most abundant tick species in Germany [45]. *Ixodes ricinus* ticks in central Europe have a bimodal activity pattern peaking in warm and humid months, with a larger peak in spring and a smaller peak in autumn. In the Mediterranean area, a unimodal activity pattern with one big peak in spring is common, which is now also more often observed in central Europe, as shifts in temperature and precipitation result in a decline in the impact of microclimatic conditions like sufficient humidity [46,47]. In our study, we also did not find an activity peak in autumn, but observed a unimodal activity pattern with a peak in spring for nymphs and adults. The ratio of *I. ricinus* complex adult ticks collected in ecotones and forests was similar, fitting their described primary habitat of forests and shrubbery [48]. In all three considered seasons, *I. ricinus* complex nymphs were more often collected in the forest compared to the ecotone. One previous study from southern Germany showed a positive effect of humidity on the occurrence of nymphs [46]. In the forest areas investigated, a base layer with higher humidity serves as protection from desiccation during hotter months, explaining why more ticks were collected in the forest sites compared to the ecotone [2].

Less than a tenth of the collected ticks belonged to the species *Dermacentor reticulatus* [45]. Larvae and nymphs of *D. reticulatus* commonly show nidicolous behaviour and live in burrows and nests of small mammals [33]. This is why only adult individuals were collected in the current study. *Dermacentor reticulatus* ticks show a quiescence phase over summer and two activity peaks, one in spring and one in autumn [24,49], which we observed in our study. Most *D. reticulatus* ticks (93.6%) were flagged in the ecotone which

is in concordance with the described natural habitat of bushy pastures, meadows, and open forests [48,49].

As expected, most *Clethrionomys glareolus* (97.1%) and *Apodemus flavicollis* (91.7%) were trapped in the forest. Opposite to that, *Microtus arvalis* was mostly trapped in grasslands (92.6%). This distribution matches the preference of *Cl. glareolus* and *A. flavicollis* for forests and *M. arvalis* for grasslands [50,51]. *Apodemus sylvaticus* was trapped with a proportion of 74.1% in forests, which reflects their well-known common habitat shift between forests and grasslands [7,52]. Proportions of trapped *A. agrarius*, *Sorex araneus*, and *M. agrestis* were balanced in forest and grassland. These three species do not show such a strong link to either one of the two considered habitats [7,51,53].

Small mammals serve as reservoirs for many zoonotic pathogens including rickettsiae of the SFG group of diverse pathogenicity. In Germany, most known severe human cases were, however, not autochthonous [54]. The two most common species in Germany, *Rickettsia helvetica* and *R. raoultii*, are nowadays known to cause clinically unspecific symptoms such as eschars in humans [24,55].

In central Europe, DNA of *R. helvetica* and *R. raoultii* has been detected in arthropods such as fleas and various tick species like *I. ricinus*, *D. reticulatus*, and *D. marginatus*. Animals in which rickettsial DNA has been detected include rodents, racoons (*Procyon lotor*), roe deer, wild boars, and lizards [16,20,27,56,57].

To our knowledge, this is the first detection of *Rickettsia* spp. DNA in *S. minutus* from Germany. *Rickettsia* spp DNA could not be recorded in a former study from Germany, including 72 individuals of *S. minutus*, of which 16 likewise originated from the state of Thuringia [58]. A study from Norway has shown a lower infestation rate of *S. minutus* with ticks compared to investigated individuals from the genus *Apodemus* [59], which has also been displayed for shrews in a study from France [52]. This, in turn, might lead to a lower risk of infection with TBPs. As in our study, *Rickettsia* spp. DNA has been detected in *S. araneus* in other studies before [58,60].

Interestingly, individuals in forests were more often infected than those in grasslands. Among the investigated genera, *Apodemus* had the highest prevalence. As described above, the two most abundant species of the genus *Apodemus*, namely, *A. flavicollis* and *A. sylvaticus*, were mostly trapped in the forest. *Apodemus* spp. showing a higher prevalence than other small mammals has been described before. The prevalence in *A. sylvaticus* (18.5%), *A. flavicollis* (15.4%), and *A. agrarius* (8.9%) falls in line with previous findings from Germany with prevalence ranges of 0–16.2% [58,61], 13.0–23.4% [58,61,62], and 0–9% [58,62], respectively. A few studies on *A. flavicollis* from several European countries showed prevalence rates of 0% in whole blood, 1.7% in organ samples, 5.7% in whole blood, and 29.4% in spleens in Poland [63], Croatia [64], Slovakia [65], and Lithuania [60], respectively. One study from Italy found a prevalence of 6% in ear pinna samples without distinguishing between *Apodemus* species [66].

Difficulties in sequencing of *Rickettsia* spp. DNA in material of small mammal origin due to poor sensitivity of conventional PCR has been described before [58]. In our investigations, only two out of one hundred and fifteen small mammal samples positive in qPCR (24 of which had a $ct < 35$) could be sequenced. Both were from *A. flavicollis* samples and showed the highest similarity to *R. helvetica* strain AS819, which has been isolated from *I. ricinus* ticks before. *Rickettsia helvetica* has been found in *A. flavicollis* in several studies from Germany before [20,58]. One study from the Netherlands found *R. helvetica* in small rodents [16]. *Rickettsia raoultii*, on the other hand, seems to be rather rare in small mammal samples [58]. One study found *R. raoultii* in *Cl. glareolus* which were all infested with *D. reticulatus* [62]. A larger number of sequencing results in our study could have added more certainty as to whether small mammals, in particular *Apodemus* spp., take a less essential part in the life cycle of *R. raoultii*. One study from southern Germany investigated *Dermacentor* ticks and mainly voles without detecting any *Rickettsia* spp. DNA in rodent samples [67]. Two studies from China examined other mammals as potential reservoirs of *R. raoultii* and detected *R. raoultii* in horses (*Equus ferus*) and red

foxes (*Vulpes vulpes*) [68,69]. *Rickettsia helvetica* in roe deer and wild boar and *R. slovaca* in wild boar were found in studies from the Netherlands [16] and Algeria [70], respectively.

Rickettsia spp. prevalence in tick species differed from 8.6% in the *I. ricinus* complex and 46.3% in *D. reticulatus*. *Dermacentor reticulatus* often shows a higher infection rate with *Rickettsia* than *I. ricinus* [71]. For example, a study from northeast Germany noted a prevalence of 64.0% in *D. reticulatus* [49]. The determined prevalence in the *I. ricinus* complex in our study conforms to prevalences described in other studies on *I. ricinus* from Germany [21,72,73]. However, the methods and life stages of ticks differed among the published studies; therefore, direct comparison of prevalence has to be regarded with caution. Adult ticks showed a statistically higher infection risk than nymphs, which have had only one blood meal as larvae. Nevertheless, it has to be noted that we only analysed nymphs from the *I. ricinus* complex and no immature stages from *D. reticulatus*. In a study also analysing feeding immatures, it has been proposed that transovarial transmission of *Rickettsia* spp. in ticks plays a more important role in *D. reticulatus* than in *I. ricinus* [20]. Success of transovarial and transstadial transmission of *R. raoultii* in *D. reticulatus* have been presented to be 90.0% and 98.0%, respectively [74]. This supports the observation in our study that *D. reticulatus* has a higher prevalence than *I. ricinus*. Also, their preference for voles as hosts, which had a comparably low prevalence in our study, might reinforce this approach.

Regarding only *I. ricinus* ticks, the infection risk was higher in adults than in nymphs. This has been observed in most but not all studies examining exclusively *I. ricinus* [31,72,75]. In spring and summer, ticks were significantly more often infected than in autumn. In the statistical analysis regarding solely *I. ricinus* ticks, no seasonal influence could be noted. In other European studies, in which only *I. ricinus* ticks were considered, the seasonal influence differed. Overall, no pattern can be noted as in some studies from Germany ticks collected in summer and autumn had higher infection rate than in spring [19,76], and in another study ticks collected in summer had a higher infection rate than in autumn and spring [72]. In opposite to that stands the finding from a study from Denmark in which ticks flagged in spring were significantly more often infected than ticks from summer and autumn [77]. In one study analysing only *D. reticulatus* from northeast Germany, no seasonal influence on prevalence was recognised [49].

Habitat type did not influence the prevalence of *Rickettsia* in ticks in our study. Other studies in Europe also did not find any statistical effect of different landscapes on *Rickettsia* prevalence in *I. ricinus* ticks [29–31]. It seems that microclimatic factors may play a more important role for *Rickettsia* abundance in ticks than the habitat itself. A study design of field and experimental studies taking the microclimate into account could be useful to identify additional driving parameters for tick infection.

Numbers of co-infections with both *Borrelia* spp. and *Rickettsia* spp. in small mammal species were low, except in *S. araneus* (10%). The co-infection rates in ticks with these two bacteria were low in our study but have been shown to correlate positively before [78]. Another study with a higher prevalence of both bacteria than in our study did not show this positive association [79]. In our study, the only observed effect was a slight tendency of a negative association of *Rickettsia* spp. infection with *Borrelia* spp. occurrence in ticks in spring. Studies investigating co-infections in small mammals are scarce. As *S. araneus* was the only small mammal species with a high co-infection rate in our study and was rarely regarded in previous studies, further research focusing on this correlation should be considered.

In our study, 68.8% of the tick samples that were positive in qPCR could be amplified by conventional PCR, sequenced and identified as either *R. helvetica* or *R. raoultii*. *Rickettsia helvetica* is the most abundant *Rickettsia* species in Germany, as in our study. Interestingly, it was the only *I. ricinus* associated *Rickettsia* species that was determined. Even though *R. monacensis* detection is not that rare in Germany, it seems to occur more often in southern Germany [31,72,73,76]. The *R. helvetica* sequences from our study were identical to those previously found in *I. persulcatus* from Russia and in *I. ricinus* from Germany. *Rickettsia*

raoultii sequences found here had been detected in China earlier. Compared to other tick species, *R. raoultii* has a strong link to *D. reticulatus* [9] and was also the only *Rickettsia* species we could detect in *D. reticulatus* in our study. As *I. ricinus* and *D. reticulatus* are the two most common tick species in central Europe, their monitoring is one important tool to gain knowledge about risk factors for human and animal infections.

5. Conclusions

The prevalence of *Rickettsia* spp. in small mammals and ticks determined in this study falls in line with previous studies from Germany. Adult ticks had a statistically higher infection risk than nymphs. *Dermacentor reticulatus* showed a significantly higher prevalence than *I. ricinus* ticks. In our study, we found *R. raoultii* and *R. helvetica*, which are both associated with cases of human illness. Interestingly, this study showed no influence of habitat type on the prevalence of *Rickettsia* in ticks but in small mammals, which were significantly more often infected in forests than in grasslands. A possible explanation may be the high prevalence in small mammals of the genus *Apodemus*, which are more abundant in forests. Nevertheless, habitat type should always be considered in a one health perspective, as it has a massive impact on the abundance of potential pathogen reservoirs.

Author Contributions: Conceptualization, N.K., C.I., R.G.U., J.J., M.P., and A.O.; methodology, N.K., C.I., and A.O.; sample collection, N.K., C.I., K.J., and A.O.; validation, C.A. and A.O.; formal analysis, C.A., C.I., and A.O.; investigation, C.A., N.K., Z.R.-S., and A.O.; data curation, C.A., N.K., C.I., and A.O.; writing—original draft preparation, C.A.; writing—review and editing, N.K., C.I., K.J., Z.R.-S., R.G.U., J.J., M.P., and A.O.; visualization, C.A.; supervision, M.P. and A.O.; project administration, N.K., C.I., and A.O.; funding acquisition, N.K., R.G.U., and J.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The small mammal trapping was commissioned and funded by the Federal Environment Agency within the Environment Research Plan of the German Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation, Building, and Nuclear Safety (grant number 3716484310 to JJ) and partially supported by the Bundesministerium für Bildung und Forschung through the research net Zoonotic Infectious Diseases (consortium RoBoPub; grant number 01K11721A/01K12004A to RGU and 01K11721E/01K12004E to JJ). This study was also partially funded by the Veterinarian Faculty of the University of Leipzig through the Young Scientists Award (to NK).

Institutional Review Board Statement: Permits for small mammal trapping were approved by the Thuringia State Office of Consumer Protection (protocol code 22-2684-04-15-105/16).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The dataset generated and analysed during the current study is available from the corresponding author.

Acknowledgments: The publication fee of this paper was covered by The Open Access (OA) Publication Fund of the University of Leipzig. The authors would like to thank Dana Rüter and Evelin Brumme for their excellent technical assistance and lab work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

Appendix A

Table A1. Flagged tick individuals per species, per season, and in total, including larvae, nymphs, and adults.

Tick Species	Absolute Number of Ticks (Percentage in Each Season)			Total
	Spring	Summer	Autumn	
<i>Ixodes ricinus</i> complex ¹	789 (77.2%)	203 (19.9%)	30 (2.9%)	1022 (100%)
<i>Dermacentor reticulatus</i>	37 (39.8%)	1 (1.1%)	55 (59.1%)	93 (100%)
Total	826 (74.1%)	204 (18.3%)	85 (7.6%)	1115 (100%)

¹ *Ixodes ricinus* and *Ixodes inopinatus*.

Table A2. Results of a generalised linear mixed model for effects of tick species, life stage, habitat, and season on *Rickettsia* spp. infection probability in tick samples in total and in *Ixodes ricinus* complex ticks.

Factor	Estimate	Standard Error	Z Value	Probability (> z)
Total				
Intercept	-2.64	0.66	-4.03	5.67×10^{-05} ***
<i>D. reticulatus</i> vs. <i>I. ricinus</i> complex	-3.96	0.64	-6.17	6.69×10^{-10} ***
Adult vs. Nymph	-0.63	0.27	-2.33	0.02 *
Ecotone vs. Forest	-0.10	0.26	-0.37	0.71
Autumn vs. Spring	4.75	0.80	5.93	3.05×10^{-09} ***
Autumn vs. Summer	4.79	0.86	5.57	2.57×10^{-08} ***
<i>Ixodes ricinus</i>				
Intercept	-1.74	0.79	-2.19	0.03 *
Adult vs. Nymph	-0.79	0.27	-2.79	0.01 **
Ecotone vs. Forest	-0.15	0.28	-0.53	0.59
Autumn vs. Spring	-0.18	0.77	-0.24	0.81
Autumn vs. Summer	0.23	0.78	0.29	0.77

Significance codes: ***—<0.001; **—0.001; *—0.01.

Table A3. Results of a generalised linear mixed model with binomial error distribution for effects of habitat, season, sex, and small mammal species on *Rickettsia* spp. infection probability in small mammals in total and in the three most abundant small mammal species (*Apodemus flavicollis*, *Clethrionomys glareolus*, and *Microtus arvalis*). NA: not available.

Factor	Estimate	Standard Error	Z Value	Probability (> z)
Total				
Intercept	-4.09	0.66	-6.20	5.78×10^{-10} ***
Grassland vs. Forest	1.83	0.40	4.56	5.22×10^{-06} ***
Spring vs. summer	0.55	0.34	1.62	0.11
<i>A. agrarius</i> vs. <i>A. flavicollis</i>	0.00	0.46	0.01	1.00
<i>A. agrarius</i> vs. <i>A. sylvaticus</i>	0.70	0.50	1.38	0.17
<i>A. agrarius</i> vs. <i>M. arvalis</i>	0.44	0.53	0.83	0.41
<i>A. agrarius</i> vs. <i>Cl. glareolus</i>	-1.046	0.49	-2.12	0.03 *
<i>Apodemus flavicollis</i>				
Intercept	-17.73	223.46	-0.08	0.94
Female vs. Male	-0.10	0.63	-0.17	0.87
Grassland vs. Forest	16.58	223.46	0.07	0.94
Spring vs. Summer	-0.37	0.58	-0.64	0.52
<i>Clethrionomys glareolus</i>				
Intercept	-1.32	1.70	-0.78	0.44
Female vs. Male	-0.42	1.00	-0.42	0.67
Grassland vs. Forest	-0.66	1.42	-0.47	0.64
Spring vs. Summer	-0.17	0.75	-0.23	0.82
<i>Microtus arvalis</i>				
Intercept	-5.20	1.30	-3.98	6.8×10^{-05} ***
Female vs. Male	1.06	0.86	1.23	0.22
Grassland vs. Forest	1.97	0.60	3.31	0.000948 ***
Spring vs. Summer	1.28	1.09	1.18	0.24

Significance codes: ***—<0.001; *—0.01

Table A4. Co-infections of *Borrelia* spp. and *Rickettsia* spp. in *I. ricinus* ticks. Data of *Borrelia* spp. investigation were available from Król et al. [32]. No.: Number; F: female; M: male; and N: nymph.

Species	Year	Season	Habitat	<i>Borrelia</i> spp.	<i>Rickettsia</i> spp.
No. of Co-Infected Ticks/Total (%)	No. of Co-Infected Ticks/Total (%)	No. of Co-Infected Ticks/Total (%)	No. of Co-Infected Ticks/Total (%)		
<i>I. ricinus</i> complex 9/1094 (0.8)	2018 5/565 (0.9)	spring 5/436 (1.1)	ecotone	<i>B. valaisiana</i>	<i>R. helvetica</i>
				<i>B. afzelii</i>	
				<i>Borrelia</i> spp.	
	forest	<i>B. valaisiana</i>			
		<i>B. afzelii</i>			
			ecotone		
2019 4/529 (0.8)	spring 3/386 (0.8)	ecotone	1/101 (1.0)	<i>Borrelia</i> spp.	
		forest	2/285 (0.7)		
		summer	forest		1/141 (0.7)

Table A5. Co-infections of *Borrelia* spp. and *Rickettsia* spp. in small mammals. Data of *Borrelia* spp. investigation were available from Król et al. [32]. No.: Number.

No. of Co-Infected Animals/Total (%)	Year	Season	Habitat	Species	<i>Borrelia</i> spp.	<i>Rickettsia</i> spp.	
	No. of Co-Infected Animals/Total (%)						
9/1167 (0.8)	2017 1/290 (0.3)	Summer	Forest	<i>A. flavicollis</i>	<i>Borrelia</i> spp.	<i>Rickettsia</i> spp.	
				1/152 (0.7)			1/72 (1.4)
		Spring	Grassland	<i>M. arvalis</i>			
		1/23 (4.3)	1/12 (8.3)	1/12 (8.3)			
	2018 6/94 (6.4)	Summer	Grassland	<i>M. arvalis</i>			
				1/40 (2.5)			1/33 (3.0)
			Forest	<i>S. araneus</i>			2/7 (28.6)
			4/31 (12.9)	<i>Cl. glareolus</i>			2/12 (16.7)
	2019 2/783 (0.3)	Summer	Forest	<i>Cl. glareolus</i>			1/172 (0.6)
							<i>M. arvalis</i>
			2/372 (0.5)				

Table A6. Results from the co-occurrence seasonal analysis for all trapped ticks and mammals. Alpha maximum likelihood estimator (MLE) can be interpreted as an odds ratio for co-occurrence. The accompanying confidence interval (CI) was calculated according to Blaker [80].

Class	Season	Alpha MLE	Blaker CI (Lower)	Blaker CI (Upper)	p-Value
Arachnida (ticks)	Spring	-0.72	-1.60	0.00	0.06
	Summer	-0.54	-3.62	1.39	1.00
	Autumn	ND ¹	ND ¹	ND ¹	ND ¹
Mammalia (Small mammals)	Spring	0.09	-3.05	2.05	1.00
	Summer	0.32	-0.55	1.11	0.51

¹ ND: not determined; no determination possible due to low numbers of ticks in autumn.

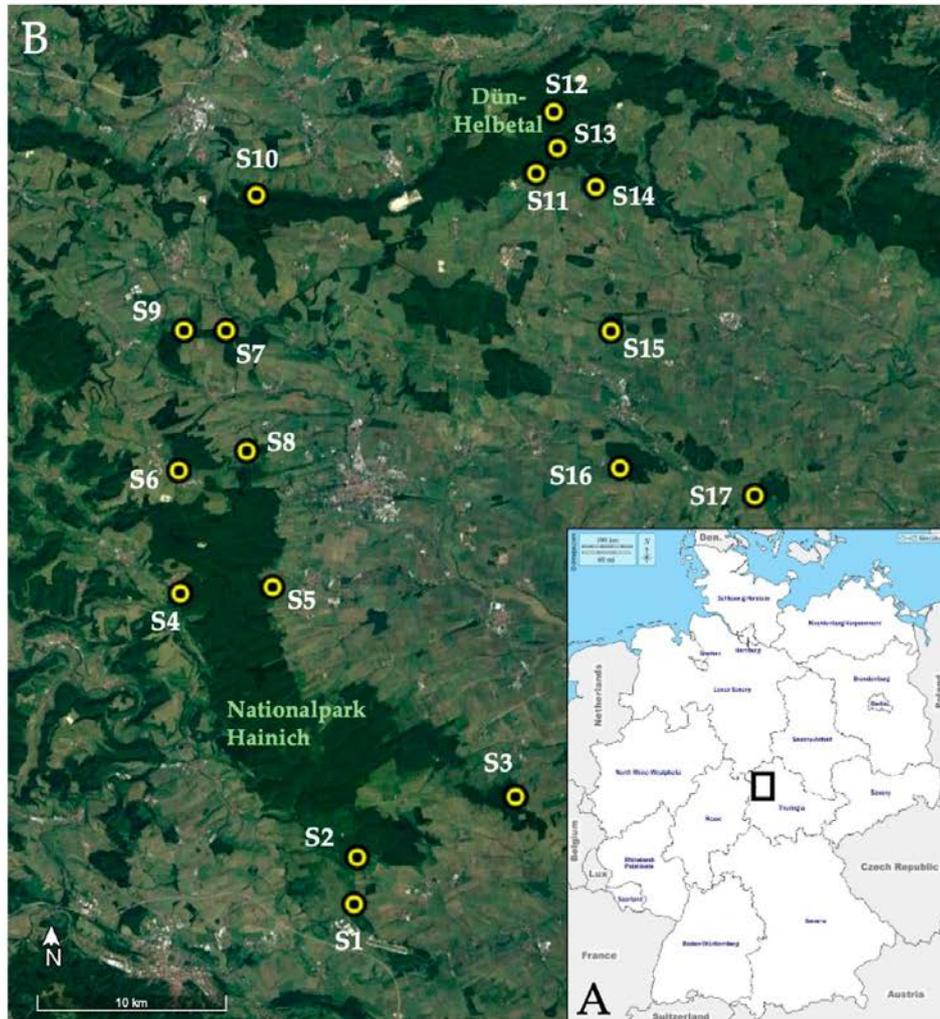


Figure A1. (A) Location of study sites in Germany (inset). (B) Study sites with *Rickettsia* DNA positive samples. S = Study site. The image was created using Google Earth Pro, Map: Google Earth ©2023 Google, Image Landsat/Copernicus ©2023 GeoBasis-DE/BKG.

References

1. Petney, T.; Pfäffle, M.; Skuballa, J. An annotated checklist of the ticks (Acari: Ixodida) of Germany. *Syst. Appl. Acarol.* **2012**, *17*, 115–170. <https://doi.org/10.11158/saa.17.2.2>.
2. Gray, J.; Kahl, O.; Zintl, A. What do we still need to know about *Ixodes ricinus*? *Ticks Tick. Borne Dis.* **2021**, *12*, 101682. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101682>.
3. Stanko, M.; Derdákóvá, M.; Špitalská, E.; Kazimírová, M. Ticks and their epidemiological role in Slovakia: from the past till present. *Biologia (Bratisl)* **2021**, 1–36. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00845-3>.

4. Medlock, J.M.; Hansford, K.M.; Bormane, A.; Derdakova, M.; Estrada-Peña, A.; George, J.C.; Golovljova, I.; Jaenson, T.G.; Jensen, J.K.; Jensen, P.M.; et al. Driving forces for changes in geographical distribution of Ixodes ricinus ticks in Europe. *Parasit. Vectors* **2013**, *6*, 1. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-1>.
5. Drehmann, M.; Springer, A.; Lindau, A.; Facht, K.; Mai, S.; Thoma, D.; Schneider, C.R.; Chitimia-Dobler, L.; Bröker, M.; Dobler, G.; et al. The Spatial Distribution of Dermacentor Ticks (Ixodidae) in Germany-Evidence of a Continuing Spread of Dermacentor reticulatus. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 578220. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.578220>.
6. Burri, C.; Schumann, O.; Schumann, C.; Gern, L. Are Apodemus spp. mice and Myodes glareolus reservoirs for Borrelia miyamotoi, Candidatus Neoehrlichia mikurensis, Rickettsia helvetica, R. monacensis and Anaplasma phagocytophilum? *Ticks Tick. Borne Dis.* **2014**, *5*, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.007>.
7. Kraft, R. Mäuse und Spitzmäuse in Bayern Verbreitung, Lebensraum, Bestandssituation; Ulmer: Stuttgart (Hohenheim), Germany, 2008.
8. Krawczyk, A.I.; van Duijvendijk, G.L.A.; Swart, A.; Heylen, D.; Jaarsma, R.I.; Jacobs, F.H.H.; Fonville, M.; Sprong, H.; Takken, W. Effect of rodent density on tick and tick-borne pathogen populations: consequences for infectious disease risk. *Parasit. Vectors* **2020**, *13*, 34. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3902-0>.
9. Parola, P.; Paddock, C.D.; Socolovschi, C.; Labruna, M.B.; Mediannikov, O.; Kernif, T.; Abdad, M.Y.; Stenos, J.; Bitam, I.; Fournier, P.E.; et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26*, 657–702. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-13>.
10. Kim, H.K. Rickettsia-host-tick interactions: Knowledge advances and gaps. *Infect. Immun.* **2022**, *90*, e00621–00621.
11. Merhej, V.; Raoult, D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **2011**, *86*, 379–405. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00151.x>.
12. Hauck, D.; Jordan, D.; Springer, A.; Schunack, B.; Pachnicke, S.; Fingerle, V.; Strube, C. Transovarial transmission of Borrelia spp., Rickettsia spp. and Anaplasma phagocytophilum in Ixodes ricinus under field conditions extrapolated from DNA detection in questing larvae. *Parasit. Vectors* **2020**, *13*, 176. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04049-7>.
13. Raoult, D.; Roux, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **1997**, *10*, 694–719. <https://doi.org/10.1128/cmr.10.4.694>.
14. Socolovschi, C.; Mediannikov, O.; Raoult, D.; Parola, P. The relationship between spotted fever group Rickettsiae and ixodid ticks. *Vet. Res.* **2009**, *40*, 34. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009017>.
15. Karbowiak, G.; Biernat, B.; Stańczak, J.; Szewczyk, T.; Werszko, J. The role of particular tick developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens affecting humans in Central Europe. 3. Rickettsiae. *Ann. Parasitol.* **2016**, *62*, 89–100. <https://doi.org/10.17420/ap6202.38>.
16. Sprong, H.; Wielinga, P.R.; Fonville, M.; Reusken, C.; Brandenburg, A.H.; Borgsteede, F.; Gaasenbeek, C.; van der Giessen, J.W. Ixodes ricinus ticks are reservoir hosts for Rickettsia helvetica and potentially carry flea-borne Rickettsia species. *Parasit. Vectors* **2009**, *2*, 41. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-41>.
17. Galfsky, D.; Król, N.; Pfeffer, M.; Obiegala, A. Long-term trends of tick-borne pathogens in regard to small mammal and tick populations from Saxony, Germany. *Parasit. Vectors* **2019**, *12*, 131. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3382-2>.
18. Wölfel, R.; Terzioglu, R.; Kiessling, J.; Wilhelm, S.; Essbauer, S.; Pfeffer, M.; Dobler, G. Rickettsia spp. in Ixodes ricinus ticks in Bavaria, Germany. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1078*, 509–511. <https://doi.org/10.1196/annals.1374.133>.
19. May, K.; Strube, C. Prevalence of Rickettsiales (Anaplasma phagocytophilum and Rickettsia spp.) in hard ticks (Ixodes ricinus) in the city of Hamburg, Germany. *Parasitol. Res.* **2014**, *113*, 2169–2175. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3869-x>.
20. Obiegala, A.; Oltersdorf, C.; Silaghi, C.; Kiefer, D.; Kiefer, M.; Woll, D.; Pfeffer, M. Rickettsia spp. in small mammals and their parasitizing ectoparasites from Saxony, Germany. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* **2016**, *5*, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.08.008>.
21. Tappe, J.; Strube, C. Anaplasma phagocytophilum and Rickettsia spp. infections in hard ticks (Ixodes ricinus) in the city of Hanover (Germany): Revisited. *Ticks and Tick-borne Diseases* **2013**, *4*, 432–438. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.04.009>.
22. Azagi, T.; Hoornstra, D.; Kremer, K.; Hovius, J.W.R.; Sprong, H. Evaluation of Disease Causality of Rare Ixodes ricinus-Borne Infections in Europe. *Pathogens* **2020**, *9*. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020150>.
23. de Sousa, R.; Dos Santos, M.L.; Cruz, C.; Almeida, V.; Garrote, A.R.; Ramirez, F.; Seixas, D.; Manata, M.J.; Maltez, F. Rare Case of Rickettsiosis Caused by Rickettsia monacensis, Portugal, 2021. *Emerg Infect Dis* **2022**, *28*, 1068–1071. <https://doi.org/10.3201/eid2805.211836>.
24. Buczek, W.; Koman-Lžko, A.; Buczek, A.M.; Buczek, A.; Bartosik, K.; Kulina, D.; Ciura, D. Spotted fever group rickettsiae transmitted by Dermacentor ticks and determinants of their spread in Europe. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2020**, *27*, 505–511. <https://doi.org/10.26444/aaem/120602>.
25. Parola, P.; Roveery, C.; Rolain, J.M.; Brouqui, P.; Davoust, B.; Raoult, D. Rickettsia slovaca and R. raoultii in tick-borne Rickettsioses. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 1105–1108. <https://doi.org/10.3201/eid1507.081449>.
26. Rieg, S.; Schmoldt, S.; Theilacker, C.; de With, K.; Wölfel, S.; Kern, W.V.; Dobler, G. Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA) acquired in Southwestern Germany. *BMC Infect. Dis.* **2011**, *11*, 167. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-167>.
27. Spítalská, E.; Stefanidesová, K.; Kocianová, E.; Boldiš, V. Rickettsia slovaca and Rickettsia raoultii in Dermacentor marginatus and Dermacentor reticulatus ticks from Slovak Republic. *Exp. Appl. Acarol.* **2012**, *57*, 189–197. <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9539-8>.
28. Rizzoli, A.; Hauffe, H.; Carpi, G.; Vourc, H.G.; Neteler, M.; Rosa, R. Lyme borreliosis in Europe. *Euro Surveill.* **2011**, *16*.

29. Reye, A.L.; Hübschen, J.M.; Sausy, A.; Muller, C.P. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 2923–2931. <https://doi.org/10.1128/aem.03061-09>.
30. Špitalská, E.; Boldiš, V.; Derdáková, M.; Selyemová, D.; Rusňáková Tarageľová, V. Rickettsial infection in *Ixodes ricinus* ticks in urban and natural habitats of Slovakia. *Ticks Tick. Borne Dis.* **2014**, *5*, 161–165. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.10.002>.
31. Knoll, S.; Springer, A.; Hauck, D.; Schunack, B.; Pachnicke, S.; Strube, C. Regional, seasonal, biennial and landscape-associated distribution of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. infections in *Ixodes* ticks in northern Germany and implications for risk assessment at larger spatial scales. *Ticks Tick. Borne Dis.* **2021**, *12*, 101657. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101657>.
32. Król, N.; Obiegala, A.; Imholt, C.; Arz, C.; Schmidt, E.; Jeske, K.; Ulrich, R.G.; Rentería-Solís, Z.; Jacob, J.; Pfeffer, M. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks and small mammals from different habitats. *Parasit. Vectors* **2022**, *15*, 195. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05326-3>.
33. Estrada-Peña, A.; Mihalca, A.D.; Petney, T.N. *Ticks of Europe and North Africa: a guide to species identification*; Springer: Cham, 2017.
34. Siuda, K. *Kleszcze polski (Acari: Ixodida): systematyka i rozmieszczenie*; Polskie Towarzystwo Parazytologiczne: Warszawa, 1993.
35. Estrada-Peña, A.; Nava, S.; Petney, T. Description of all the stages of *Ixodes inopinatus* n. sp. (Acari: Ixodidae). *Ticks Tick. Borne Dis.* **2014**, *5*, 734–743. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.05.003>.
36. Jeske, K.; Weber, S.; Pfaff, F.; Imholt, C.; Jacob, J.; Beer, M.; Ulrich, R.G.; Hoffmann, D. Molecular Detection and Characterization of the First Cowpox Virus Isolate Derived from a Bank Vole. *Viruses* **2019**, *11*, 1075. <https://doi.org/10.3390/v11111075>.
37. Jeske, K.; Jacob, J.; Drewes, S.; Pfeffer, M.; Heckel, G.; Ulrich, R.G.; Imholt, C. Hantavirus-Leptospira coinfections in small mammals from central Germany. *Epidemiol. Infect.* **2021**, *149*, e97. <https://doi.org/10.1017/s0950268821000443>.
38. Wölfel, R.; Essbauer, S.; Dobler, G. Diagnostics of tick-borne rickettsioses in Germany: A modern concept for a neglected disease. *Int. J. Med. Microbiol.* **2008**, *298*, 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.11.009>.
39. Roux, V.; Raoult, D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2000**, *50 Pt. 4*, 1449–1455. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-4-1449>.
40. Bates, D.; Mächler, M.; Bolker, B.; Walker, S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Stat. Softw.* **2015**, *67*, 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>.
41. Mainali, K.P.; Slud, E.; Singer, M.C.; Fagan, W.F. A better index for analysis of co-occurrence and similarity. *Sci. Adv.* **2022**, *8*, eabj9204. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj9204>.
42. Mainali, K.P.; Slud, E.; Mainali, M.K. Package ‘CooccurrenceAffinity’. Available online: <https://cran.r-project.org/web/packages/CooccurrenceAffinity/CooccurrenceAffinity.pdf> (accessed on 30 June 2023).
43. Speck, S.; Kern, T.; Aistleitner, K.; Dilcher, M.; Dobler, G.; Essbauer, S. In vitro studies of *Rickettsia helvetica*-host cell interactions: Confocal laser scanning microscopy of *Rickettsia helvetica*-infected eukaryotic cell lines. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, e0006151. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006151>.
44. Kartashov, M.Y.; Glushkova, L.I.; Mikryukova, T.P.; Korabelnikov, I.V.; Egorova, Y.I.; Tupota, N.L.; Protopopova, E.V.; Konovalova, S.N.; Ternovoi, V.A.; Loktev, V.B. Detection of *Rickettsia helvetica* and *Candidatus R. tarasevichiae* DNA in *Ixodes persulcatus* ticks collected in Northeastern European Russia (Komi Republic). *Ticks Tick. Borne Dis.* **2017**, *8*, 588–592. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.04.001>.
45. Rubel, F.; Brugger, K.; Chitimia-Dobler, L.; Dautel, H.; Meyer-Kaysner, E.; Kahl, O. Atlas of ticks (Acari: Argasidae, Ixodidae) in Germany. *Exp. Appl. Acarol.* **2021**, *84*, 183–214. <https://doi.org/10.1007/s10493-021-00619-1>.
46. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2014.12070.x>.
47. Černý, J.; Lynn, G.; Hrnková, J.; Golovchenko, M.; Rudenko, N.; Grubhoffer, L. Management Options for *Ixodes ricinus*-Associated Pathogens: A Review of Prevention Strategies. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*. <https://doi.org/10.3390/ijerph17061830>.
48. Nowak-Chmura, M.; Siuda, K. Ticks of Poland. Review of contemporary issues and latest research. *Ann. Parasitol.* **2012**, *58*, 125–155.
49. Kohn, M.; Krücken, J.; McKay-Demeler, J.; Pachnicke, S.; Krieger, K.; von Samson-Himmelstjerna, G. *Dermacentor reticulatus* in Berlin/Brandenburg (Germany): Activity patterns and associated pathogens. *Ticks Tick. Borne Dis.* **2019**, *10*, 191–206. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.10.003>.
50. Von Blanckenhagen, F.; Städtler, T. Small mammal communities in agricultural landscapes in Germany: review of field data over the last decade. *Julius-Kühn-Archiv* **2011**, *75*.
51. Hotopp, I.; Walther, B.; Fuelling, O.; Reil, D.; Hesse, C.; Below, D.A.; Imholt, C.; Jacob, J. Habitat and Season Effects on Small Mammal Bycatch in Live Trapping. *Biology (Basel)* **2022**, *11*. <https://doi.org/10.3390/biology11121806>.
52. Boyard, C.; Vourc'h, G.; Barnouin, J. The relationships between *Ixodes ricinus* and small mammal species at the woodland-pasture interface. *Exp. Appl. Acarol.* **2008**, *44*, 61–76. <https://doi.org/10.1007/s10493-008-9132-3>.
53. Hauer, S.; Ansoorge, H.; Zöphel, U. *Atlas der Säugetiere Sachsens : Naturschutz und Landschaftspflege*; Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landschaft und Geologie: Zentraler Broschürenversand der Sächsischen Staatsregierung: Dresden, Germany, 2009.
54. Dobler, G.; Wölfel, R. Typhus and other rickettsioses: emerging infections in Germany. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2009**, *106*, 348–354. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2009.0348>.

55. Nilsson, K. Septicaemia with *Rickettsia helvetica* in a patient with acute febrile illness, rash and myasthenia. *J. Infect.* **2009**, *58*, 79–82. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2008.06.005>.
56. Hildebrand, J.; Perec-Matysiak, A.; Popiolek, M.; Merta, D.; Myśliwy, I.; Buńkowska-Gawlik, K. A molecular survey of spotted fever group rickettsiae in introduced raccoons (*Procyon lotor*). *Parasit. Vectors* **2022**, *15*, 162. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05280-0>.
57. Mendoza-Roldan, J.A.; Ravindran Santhakumari Manoj, R.; Latrofa, M.S.; Iatta, R.; Annoscia, G.; Lovreglio, P.; Stufano, A.; Dantas-Torres, F.; Davoust, B.; Laidoudi, Y.; et al. Role of reptiles and associated arthropods in the epidemiology of rickettsioses: A one health paradigm. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2021**, *15*, e0009090. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009090>.
58. Fischer, S.; Spierling, N.G.; Heuser, E.; Kling, C.; Schmidt, S.; Rosenfeld, U.M.; Reil, D.; Imholt, C.; Jacob, J.; Ulrich, R.G.; et al. High prevalence of *Rickettsia helvetica* in wild small mammal populations in Germany. *Ticks and Tick-borne Diseases* **2018**, *9*, 500–505. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.01.009>.
59. Mysterud, A.; Byrkjeland, R.; Qviller, L.; Viljugrein, H. The generalist tick *Ixodes ricinus* and the specialist tick *Ixodes trianguliceps* on shrews and rodents in a northern forest ecosystem—a role of body size even among small hosts. *Parasites & Vectors* **2015**, *8*, 639. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1258-7>.
60. Mardosaitė-Busaitienė, D.; Radzijeuskaja, J.; Balčiauskas, L.; Paulauskas, A. First detection of *Rickettsia helvetica* in small mammals in Lithuania. *New microbes and new infections* **2018**, *22*, 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.12.012>.
61. Schex, S.; Dobler, G.; Riehm, J.; Müller, J.; Essbauer, S. *Rickettsia* spp. in wild small mammals in Lower Bavaria, South-Eastern Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2011**, *11*, 493–502. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0060>.
62. Obiegala, A.; Król, N.; Oltersdorf, C.; Nader, J.; Pfeffer, M. The enzootic life-cycle of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) and tick-borne rickettsiae: an epidemiological study on wild-living small mammals and their ticks from Saxony, Germany. *Parasit. Vectors* **2017**, *10*, 115. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2053-4>.
63. Stańczak, J.; Racewicz, M.; Michalik, J.; Cieniuch, S.; Sikora, B.; Skoracki, M. Prevalence of infection with *Rickettsia helvetica* in feeding ticks and their hosts in western Poland. *Clin. Microbiol. Infect.* **2009**, *15* Suppl. 2, 328–329. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02261.x>.
64. Svoboda, P.; Dobler, G.; Markotić, A.; Kurolt, I.C.; Speck, S.; Habuš, J.; Vucelja, M.; Krajinović, L.C.; Tadin, A.; Margaletić, J.; et al. Survey for hantaviruses, tick-borne encephalitis virus, and *Rickettsia* spp. in small rodents in Croatia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2014**, *14*, 523–530. <https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1457>.
65. Miřková, K.; Berthová, L.; Kalúz, S.; Kazimirová, M.; Burdová, L.; Kocianová, E. First detections of *Rickettsia helvetica* and *R. monacensis* in ectoparasitic mites (Laelapidae and Trombiculidae) infesting rodents in south-western Slovakia. *Parasitol. Res.* **2015**, *114*, 2465–2472. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4443-x>.
66. Martello, E.; Mannelli, A.; Grego, E.; Ceballos, L.A.; Ragagli, C.; Stella, M.C.; Tomassone, L. *Borrelia burgdorferi* sensu lato and spotted fever group rickettsiae in small rodents and attached ticks in the Northern Apennines, Italy. *Ticks and Tick-borne Diseases* **2019**, *10*, 862–867. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.04.005>.
67. 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*, 145–147. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.04.001>.
68. Chang, Q.C.; Hu, Y.; Wu, T.T.; Ma, X.X.; Jiang, B.G.; Jia, N.; Wang, A.Q.; Jiang, J.F. The Role of Ranged Horses in Eco-Epidemiology of *Rickettsia raoultii* Infection in China. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 795500. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.795500>.
69. Liu, G.; Zhao, S.; Tan, W.; Hornok, S.; Yuan, W.; Mi, L.; Wang, S.; Liu, Z.; Zhang, Y.; Hazihan, W.; et al. *Rickettsia* spp. in red fox (*Vulpes vulpes*), marbled polecat (*Vormela peregusna*) and their ticks in northwestern China. *Parasit. Vectors* **2021**, *14*, 204. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04718-1>.
70. Zeroual, F.; Leulmi, H.; Bitam, I.; Benakhla, A. Molecular evidence of *Rickettsia slovaca* in spleen of wild boars in northeastern Algeria. *New Microbes New Infect.* **2018**, *24*, 17–20. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.03.008>.
71. Stańczak, J.; Biernat, B.; Racewicz, M.; Zalewska, M.; Matyjasek, A. Prevalence of different *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks (Acari: Ixodidae) in north-eastern Poland. *Ticks Tick. Borne Dis.* **2018**, *9*, 427–434. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.12.010>.
72. Schorn, S.; Pfister, K.; Reulen, H.; Mahling, M.; Silaghi, C. Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Parasit. Vectors* **2011**, *4*, 135. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-135>.
73. Silaghi, C.; Gilles, J.; Höhle, M.; Pradel, I.; Just, F.T.; Fingerle, V.; Küchenhoff, H.; Pfister, K. Prevalence of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in southern Germany. *J. Med. Entomol.* **2008**, *45*, 948–955. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[948:posfgr\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[948:posfgr]2.0.co;2).
74. Samoylenko, I.; Shpynov, S.; Raoult, D.; Rudakov, N.; Fournier, P.E. Evaluation of *Dermacentor* species naturally infected with *Rickettsia raoultii*. *Clin. Microbiol. Infect.* **2009**, *15* Suppl. 2, 305–306. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02249.x>.
75. Hildebrandt, A.; Krämer, A.; Sachse, S.; Straube, E. Detection of *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia). *Ticks Tick. Borne Dis.* **2010**, *1*, 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2009.11.005>.
76. Blazejak, K.; Janacek, 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. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2537-2>.

77. Kantsø, B.; Svendsen, C.B.; Jensen, P.M.; Vennestrøm, J.; Krogfelt, K.A. Seasonal and habitat variation in the prevalence of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks from Denmark. *Ticks Tick. Borne Dis.* **2010**, *1*, 101–103. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.01.004>.
78. Raulf, M.K.; Jordan, D.; Fingerle, V.; Strube, C. Association of *Borrelia* and *Rickettsia* spp. and bacterial loads in *Ixodes ricinus* ticks. *Ticks Tick. Borne Dis.* **2018**, *9*, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.10.014>.
79. Knoll, S.; Springer, A.; Hauck, D.; Schunack, B.; Pachnicke, S.; Fingerle, V.; Strube, C. Distribution of *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes* tick populations in Northern Germany, co-infections with Rickettsiales and assessment of potential influencing factors. *Med. Vet. Entomol.* **2021**, *35*, 595–606. <https://doi.org/10.1111/mve.12537>.
80. Blaker, H. Confidence curves and improved exact confidence intervals for discrete distributions. *Can. J. Stat.* **2000**, *28*, 783–798.

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

4 Diskussion

Viele Studien existieren, welche die Prävalenz von Rickettsien in Kleinsäugetieren und besonders in Zecken eruieren (MAY und STRUBE 2014, FISCHER et al. 2018). Allerdings behandeln die Studien selten bestimmte Aspekte wie verschiedene Lebensräume der Kleinsäugetiere und Zecken und den möglichen Einfluss der beiden Gruppen aufeinander. In der vorliegenden Studie wurde das Vorkommen von verschiedenen Zecken- und Kleinsäugetierspezies in Grasland und Waldgebieten untersucht. Außerdem wurden zum ersten Mal Daten über Rickettsienspezies und -prävalenz in Zecken und Kleinsäugetieren in Mitteldeutschland in verschiedenen Lebensräumen erhoben und analysiert. Zusätzlich wurden mithilfe vorhandener Daten aus einer vorangegangenen Studie Daten zu Ko-Infektionen mit den zwei Bakteriengattungen Rickettsien und Borrelien in Zecken und Kleinsäugetieren untersucht.

Die am häufigsten vorkommende Zeckenart in dieser Studie war *Ixodes ricinus*, welche in Deutschland am häufigsten vertreten sind (RUBEL et al. 2021). Die Zeckenart *I. inopinatus* haben wir mit *I. ricinus* zusammengefasst. Eine genaue Speziesunterscheidung hätte aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit eine umfangreiche molekularbiologische Untersuchung gefordert, welche nicht durchgeführt wurde (ROLLINS et al. 2023). Weiterhin wird aufgrund neuerer Untersuchungen in Frage gestellt, ob es sich bei ehemals morphologisch als *I. inopinatus* identifizierten Zecken in Deutschland überhaupt um diese Zeckenspezies handelt. Das tatsächliche Vorkommen und die Verbreitung dieser Zeckenart in Deutschland bedürfen weitere Untersuchungen (ROLLINS et al. 2023).

Weniger als ein Fünftel (18,4 %) der gesammelten Zecken des *I. ricinus*-Komplex waren adult. Eine Studie mit umfangreichem Datensatz (n=10.764) aus dem Bereich der FSME-Überwachung in Deutschland legte mit 19,4 % gesammelten adulten Zecken ein sehr ähnliches Verhältnis von adulten und subadulten Zecken dar (CHITIMIA-DOBLER et al. 2017). In einer Studie aus Süddeutschland (n=6.521), welche die saisonale Aktivität von *I. ricinus* untersuchte, wird ebenfalls ein gleichartiges Verhältnis von adulten (14,6 %) zu subadulten Zecken beschrieben (SCHULZ et al. 2014). In unserer Studie konnten wir ein unimodales Aktivitätsmuster von Nymphen und adulten Zecken mit Höhepunkt im Frühjahr erkennen. Ihr Vorkommen nahm im Verlauf des Jahres ab. Im Herbst konnten wir keinen zweiten Höhepunkt feststellen. In Mitteleuropa haben *I. ricinus* Zecken häufig ein bimodales Aktivitätsprofil mit Höhepunkten in den feuchten und warmen Monaten, einem größeren im Frühjahr und einem kleineren im Herbst (SCHULZ et al. 2014). Eine Studie aus Frankreich untersuchte den Einfluss

von meteorologischen und klimatischen Faktoren auf Aktivitätsprofile von Nymphen von *I. ricinus*. In wärmeren Regionen bzw. dem Mittelmeerraum zeigten die Arthropoden ein unimodales Aktivitätsprofil mit Höhepunkt im Frühjahr (WONGNAK et al. 2022). Aufgrund von Veränderungen bei Temperaturen und Niederschlägen kann in Zukunft auch in Mitteleuropa häufiger ein unimodales Aktivitätsprofil wie auch in unserer Studie erwartet werden. Obwohl Nymphen und adulte Zecken eher synchrone Aktivitätsprofile aufweisen, und Larven erst ab Mai einen ersten Aktivitätshöhepunkt und einen zweiten im Sommer zeigen, gibt es regionale wie auch jährliche Unterschiede in der saisonalen Zeckenaktivität (KAHL und GRAY 2023).

Besonders in Bezug auf das Habitat ist die Unterscheidung nach Lebensstadium von Bedeutung. Adulte Zecken des *I. ricinus*-Komplexes zeigten sich im Wald und im Ökoton zwischen Wald- und Grasgebieten in einem ausgeglichenen Verhältnis in unserer Studie. Damit folgen sie ihrem beschriebenen Haupthabitat von Wald, Waldrändern und Gebüsch (NOWAK-CHMURA und SIUDA 2012, ČERNÝ et al. 2020). Nymphen des *I. ricinus*-Komplexes wurden in allen drei Jahreszeiten häufiger in Waldgebieten als im Ökoton gesammelt. Wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, sind Zecken im subadulten Lebensstadium empfindlicher gegenüber Austrocknung verglichen mit den adulten Tieren. Somit ist dieses Ergebnis nicht verwunderlich, da in den Waldgebieten die Bodenschicht als Schutz vor Austrocknung in den heißen Monaten dienen kann (KAHL und GRAY 2023). Eine Studie aus Süddeutschland konnte an vielen untersuchten Standorten einen positiven Effekt von Feuchtigkeit auf das Vorkommen von Nymphen zeigen (SCHULZ et al. 2014). Besonders herabgefallene Blätter der Rotbuche (*Fagus sylvatica*) und von Eichen (*Quercus* spp.) bilden durch ihre lange Zersetzungszeit ein ansprechendes Habitat mit einem stabilen Feuchtigkeitslevel und Schutz vor Sonneneinstrahlung (KAHL und GRAY 2023). In unserem Untersuchungsgebiet des Hainich-Dün Nationalparks ist die Rotbuche die vorwiegend vorkommende Baumart (WEISSER et al. 2023)

Die Zeckenspezies *Dermacentor reticulatus* kommt in Deutschland am zweithäufigsten vor (RUBEL et al. 2023). In unserer Studie war sie mit weniger als einem Zehntel (7,3 %) der gesammelten Zecken vertreten. Zwei Studien aus Sachsen mit demselben Untersuchungsgebiet aus verschiedenen Jahren zeigten unterschiedliche Anteile von wirtssuchenden *D. reticulatus* im Verhältnis zu *I. ricinus* (5,2 - 39,3 % *D. reticulatus*) (SILAGHI et al. 2012, GALFSKY et al. 2019). *Ixodes ricinus* scheint stets häufiger gesammelt zu werden, es sei denn, das Untersuchungsgebiet zielt von vornerein durch Beachtung der

Habitatspräferenzen auf die Untersuchung von *D. reticulatus* ab, wie bei einer Studie aus Nordostdeutschland. In dieser, über alle Jahreszeiten hinweg durchgeführten Studie, wurden 88,9 % *D. reticulatus* gesammelt (n=9.186) (KOHN et al. 2019). Die subadulten Lebensstadien leben in den Bauen und Nestern von Kleinsäugetieren (HORNOK 2017). Da es sich aufgrund dessen bei dieser Zeckenart um eine teilweise endophile Spezies handelt, konnten in unserer Studie nur adulte Stadien dieser Art gesammelt werden. Verglichen mit den sympatrischen, in allen Stadien exophilen Zecken des *I. ricinus*-Komplexes, ist es schwieriger eine Aussage über die Abundanz von *D. reticulatus* durch die Flaggenmethode zu treffen (FÖLDVÁRI et al. 2016). Aus diesem Grund können Zahlen, welche durch die Flaggenmethode ermittelt wurden, nur als Richtwert für die Zeckenabundanz anerkannt werden. Die adulten Auwaldzecken zeigen in Mitteleuropa eine Ruhephase über die heißen Sommermonate und zwei Aktivitätshöhepunkte, einen im Frühjahr und einen im Herbst, was wir auch in unserer Studie nachvollziehen konnten (FÖLDVÁRI et al. 2016, KOHN et al. 2019). Die Mehrheit der *D. reticulatus*-Zecken (93,6 %) wurde im Untersuchungsgebiet des Ökotoons gesammelt, was ihrem beschriebenen natürlichen Habitat von Grasland, Weiden und offenen Wäldern entspricht (HORNOK 2017).

Die Wirte der subadulten Auwaldzecke sind hauptsächlich Kleinsäugetiere wie Spitzmäuse, Wühlmäuse und Echte Mäuse (FÖLDVÁRI et al. 2016). Das einzige aktiv nach einem Wirt suchende Stadium ist die adulte Auwaldzecke. Sie hat ein sehr großes Wirtsspektrum, bevorzugt größere Wirte wie Füchse, Wildschweine und Rothirsche und ist im Vergleich zu ihren subadulten Stadien nie auf Kleinsäugetieren zu finden (FÖLDVÁRI et al. 2016, OBIEGALA et al. 2017). *Ixodes ricinus*-Zecken sind die Wirtsvarietät betreffend sehr tolerante Ektoparasiten. Larven und Nymphen dieser Art bevorzugen ebenfalls Kleinsäugetiere, Reptilien und Vögel. Weibliche Adulte nehmen auch größere Tiere in ihre Wirtsauswahl auf (ČERNÝ et al. 2020). Innerhalb der Gruppe der Kleinsäugetiere, wird *D. reticulatus* häufiger auf Wühlmäusen als auf echten Mäusen gefunden, für *I. ricinus* scheint das Gegenteil der Fall (FÖLDVÁRI et al. 2016, OBIEGALA et al. 2016).

Wie zu erwarten, wurden *Cl. glareolus* (97,1 %) und *A. flavicollis* (91,7 %) jeweils zum Großteil in Waldgebieten gefangen. Eine sehr umfangreiche Studie, welche ungewollte Beifänge in Kleinsäugetierfallen an Untersuchungsstandorten aus sechs deutschen Bundesländern untersuchte, zeigte ebenso für beide Spezies ein vermehrtes Aufkommen in Waldgebieten verglichen mit Untersuchungsorten mit Grasland. Beide Spezies wurden ebenfalls in dem, das

für die Kleinsäuger in unserer Studie nicht untersuchte, Randgebiet mit Hecken und Büschen gefangen (HOTOPP et al. 2022). *Microtus arvalis* wurde in unserer Studie zum Großteil im Grasland gefangen (92,6 %). Dies wurde in der oben genannten Studie genauso vorgestellt, wobei auch diese Kleinsäugerspezies nachfolgend zu den Graslandhabitaten vermehrt in den Randgebieten gefangen wurde (HOTOPP et al. 2022). Dies entspricht ihren jeweils natürlichen Lebensräumen des Waldes von *Cl. glareolus* und *A. flavicollis* und des offenen Graslandes von *M. arvalis* (AULAGNIER et al. 2008). Die Waldmaus hat ein vielfältiges Habitat und fühlt sich in Wäldern, Buschlandschaften und Grasland wohl (AULAGNIER et al. 2008, BOYARD et al. 2008). In unserer Studie wurde sie etwas vermehrt in Waldgebieten gefangen (74,1 %). Die Arten *A. agrarius*, *S. araneus* und *M. agrestis* waren in den untersuchten Habitaten ausgesprochen ausgeglichen vertreten und wurden zu folgenden Anteilen im Grasland gefangen: 51,1 %, 55,0 % und 53,3 %. Keine dieser drei Spezies zeigt eine explizite, starke Bevorzugung von einem der untersuchten Habitate (AULAGNIER et al. 2008). Von den Kleinsäugerarten *A. amphibius*, *S. minutus* und *C. russula* wurden jeweils maximal vier Individuen gefangen.

Kleinsäuger stellen für viele zoonotischen Pathogene ein Reservoir dar. Zecken fungieren für einige Pathogene als Vektoren, unter anderem für einen Großteil der Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe (Spotted fever group, SFG). Durch die teilweise noch nicht gänzlich geklärte Pathogenität einiger SFG-Rickettsien ist anzunehmen, dass Erkrankungen mit diesen Bakterien häufig spät oder fehldiagnostiziert werden. Deshalb sollten sie in dem öffentlichen Gesundheitswesen mehr berücksichtigt werden, um auf der Liste der Differentialdiagnosen aufzutauchen. Abhängig von der Spezies, können Rickettsien der SFG für die*den Patient*in asymptomatisch verlaufen, leichte Symptome verursachen wie Husten, oder schwerwiegende febrile Erkrankungen bis zum Tod auslösen. In Deutschland sind die meisten bekannten schwerwiegenden Krankheitsverläufe nicht autochthon (DOBLER und WÖLFEL 2009). Die zwei am häufigsten vorkommenden Rickettsienarten in Deutschland sind *Rickettsia helvetica* und *Rickettsia raoultii*. Das Bakterium *R. helvetica* wurde zum ersten Mal 1979 nach seiner Entdeckung in einer *I. ricinus*-Zecke aus der Schweiz beschrieben (BURGDORFER et al. 1979). Nachdem die Pathogenität dieser Art lange nicht bekannt war, wurde *R. helvetica* bis heute mit Fieber, Sarkoidose und akuter Perimyokarditis assoziiert und wurde ebenfalls in einem Patienten mit den Symptomen Kopfschmerz, Myalgie, Arthralgie, septischem Fieber und Photophobie nachgewiesen (NILSSON 2009). *Rickettsia raoultii* wurde erstmals in Russland aus Zecken isoliert (MEDIANNIKOV et al. 2008). Die möglicherweise resultierenden Symptome

sind dem Akronym „SENLAT“ (Scalp eschars and neck lymphadenopathy after tick bites) entsprechenden Krankheitszeichen wie Eschar an der Kopfhaut und Lymphadenopathie (BUCZEK et al. 2020).

Die DNA von *R. helvetica* und *R. raoultii* wurde in Mitteleuropa in Arthropoden wie Flöhen und verschiedenen Zeckenspezies wie *I. ricinus*, *D. reticulatus* und *D. marginatus* nachgewiesen (HEGLASOVÁ et al. 2020). Tiere, in denen DNA von Rickettsien detektiert wurde, umfassen Nagetiere, Waschbären (*Procyon lotor*), Rehe (*Capreolus capreolus*), Wildschweine (*Sus scrofa*) und echte Eidechsen (Mauereidechse (*Podarcis muralis*), Ruineidechse (*Podarcis siculus*)) (SPRONG et al. 2009, OBIEGALA et al. 2016, MENDOZA-ROLDAN et al. 2021, HILDEBRAND et al. 2022).

In Kleinsäugetern lag die Prävalenz der Rickettsien in unserer Studie bei 9,9 %. Diese liegt im Bereich der aus Deutschland dokumentierten Prävalenzen verschiedener Studien von 0 % (Süddeutschland) über 5,2 % - 11,6 % (Bayern) und 8,0 % (vier Bundesländer) hin zu 28,6 % (Sachsen) (PLUTA et al. 2010, SCHEX et al. 2011, OBIEGALA et al. 2016, FISCHER et al. 2018). Studien von anderen europäischen Ländern geben Prävalenzen von 1,8 % (Kroatien), 6,0 % (Italien), 9,4 % (Slowakei), und 27,6 % (Litauen) an (SVOBODA et al. 2014, MIŤKOVÁ et al. 2015, MARDOSAITĖ-BUSAITIENĖ et al. 2018, MARTELLO et al. 2019). Angaben von Gesamtprävalenzen sind stets kritisch zu betrachten, da Zusammensetzung der untersuchten Kleinsäugerarten, methodische Vorgänge und Versuchsaufbau mitunter stark voneinander abweichen. Dies macht einen direkten Vergleich schwierig.

In unserer Studie wurden lediglich vier Individuen der Art *S. minutus* getestet, wovon in einem Tier Rickettsien-DNA nachgewiesen werden konnte. Nach unserem Wissen war dies der erste Nachweis von Rickettsien-DNA in dieser Spezies in Deutschland. Diese Insektenfresser kommen in den untersuchten Gebieten nicht so reichlich vor, wie viele ihre sympatrischen Kleinsäuger, was in weniger getesteten Proben resultiert. Eine Studie aus Deutschland konnte in 72 Individuen von *S. minutus*, wovon 16 gleich unseren Proben aus Thüringen stammten, keine Rickettsien-DNA nachweisen. In anderen Kleinsäugerarten der Studie detektierten sie Rickettsien-DNA (FISCHER et al. 2018). Eine Studie aus Norwegen zeigte eine geringere Infestation mit Zecken von Tieren der Art *S. minutus* im Vergleich zu den untersuchten Tieren des Genus *Apodemus*, wobei sie einen Zusammenhang mit der geringeren Körpermasse der Spitzmäuse ausmachten (MYSTERUD et al. 2015). Eine Studie aus Frankreich konnte ebenfalls eine geringere Infestation mit Zecken von Spitzmäusen als untersuchte *Apodemus* spp.

beobachten (BOYARD et al. 2008). Diese geringere Infestation, legt ein geringeres Risiko für eine Infektion mit zeckenübertragbaren Krankheiten nahe. In der Spitzmaus *S. araneus* konnte in unserer, wie auch in anderen vorigen Studien, Rickettsien-DNA nachgewiesen werden (FISCHER et al. 2018, MARDOSAITĖ-BUSAITIENĖ et al. 2018).

Interessanterweise wurde in Kleinsäufern aus dem Waldhabitat eine höhere Prävalenz von Rickettsien festgestellt als in solchen aus dem Graslandhabitat. Innerhalb der untersuchten Genera war *Apodemus* spp. das Genus mit der höchsten Prävalenz, was ebenfalls bereits in anderen Studien beobachtet wurde. Die zwei Spezies dieses Genus, welche in unserer Studie numerisch am meisten untersucht wurden, sind *A. flavicollis* und *A. sylvaticus*. Beide Arten wurden jeweils mehrheitlich in Waldgebieten gefangen. Die Prävalenzen von 18,5 % in *A. sylvaticus*, 15,4 % in *A. flavicollis*, und 8,9 % in *A. agrarius* stimmen mit Prävalenzen aus anderen Studien aus Deutschland überein, welche 0 – 16,2 % für *A. sylvaticus*, 13,0-23,4 % für *A. flavicollis*, und 0-9 % für *A. agrarius* beschreiben (SCHEX et al. 2011, OBIEGALA et al. 2017, FISCHER et al. 2018). Einige europäische Studien über *A. flavicollis* konnten Prävalenzen von 0 % in Vollblut (Polen), 1,7 % in Organproben (Kroatien), 5,7 % in Vollblut (Slowakei), und 29,4 % in Milzen (Litauen) bestimmen (STAŃCZAK et al. 2009, SVOBODA et al. 2014, MIŤKOVÁ et al. 2015, MARDOSAITĖ-BUSAITIENĖ et al. 2018). Eine Studie aus Italien beschreibt eine Rickettsienprävalenz von 6 % in Ohrproben von *Apodemus* spp. ohne jedoch zwischen verschiedenen Spezies des Genus zu unterscheiden (MARTELLO et al. 2019).

Schwierigkeiten bei der Sequenzierung von konventionellen PCR-Produkten von Kleinsäufermaterial sind bekannt. Aufgrund schwacher Sensitivität der Tests kommt es häufig zu nicht umfassend auswertbaren Ergebnissen (FISCHER et al. 2018). In unseren Untersuchungen konnten wir lediglich zwei der in der quantitativen real-time PCR (qPCR) positiven 115 Kleinsäuferproben erfolgreich sequenzieren lassen. Beide PCR-Produkte stammten von *A. flavicollis*-Tieren und zeigten die höchste Übereinstimmung mit dem *R. helvetica*-Stamm AS819, welcher von *I. ricinus*-Zecken isoliert wurde (SPECK et al. 2018). *Rickettsia helvetica* wurde schon häufiger in *A. flavicollis*-Proben aus Deutschland detektiert und scheint die häufigste Rickettsienart in Deutschland in Kleinsäufern zu sein (OBIEGALA et al. 2016, FISCHER et al. 2018). Eine Studie aus den Niederlanden konnte ebenfalls *R. helvetica* in Kleinnägern nachweisen (SPRONG et al. 2009). Eine weitere Rickettsienart, welche gängig in Kleinsäufern aus Deutschland nachgewiesen wird, ist *R. felis* (SCHEX et al. 2011, FISCHER et al. 2018). *Rickettsia raoultii* wird seltener in Kleinsäuferproben gefunden (FISCHER et al. 2018).

Eine Studie konnte *R. raoultii* in Proben von *Cl. glareolus* entdecken, wobei bei allen betroffenen Tieren eine Infestation mit *D. reticulatus*-Zecken beobachtet wurde (OBIEGALA et al. 2017). Eine größere Anzahl an Sequenzierungsergebnissen von unserer Studie hätte mehr Aussagekraft darüber haben können, ob Kleinsäuger, und im Speziellen solche des Genus *Apodemus*, möglicherweise einen weniger essenziellen Anteil im Lebenszyklus von *R. raoultii* einnehmen. Eine Studie aus Süddeutschland, welche *Dermacentor*-Zecken und hauptsächlich Wühlmäuse untersuchte, konnte keine Rickettsien-DNA in Nagerproben nachweisen (PLUTA et al. 2010). Zwei Studien in China untersuchten andere Säuger als mögliche Reservoirs für *R. raoultii*. Sie konnten *R. raoultii* in Pferden (*Equus ferus*) und Rotfüchsen (*Vulpes vulpes*) nachweisen (CHANG et al. 2021, LIU et al. 2021). In den Niederlanden fand eine Studie *R. helvetica* in Rehen und Wildschweinen und eine Studie in Algerien *R. slovaca* in Wildschweinen (SPRONG et al. 2009, ZEROUAL et al. 2018).

Die Rickettsienprävalenz in den untersuchten Zecken war bei uns 11,4 %, was zu den Ergebnissen von anderen Studien aus Deutschland passt (HILDEBRANDT et al. 2010, FRANKE et al. 2011, SILAGHI et al. 2011, RĂILEANU et al. 2022). Zwei Studien aus Deutschland, welche ausschließlich wirtssuchende Zecken untersucht haben, fanden Rickettsienprävalenzen von über 50 %. Beide Studien untersuchten Gebiete in nordwestdeutschen Städten (MAY und STRUBE 2014, BLAZEJAK et al. 2017). Da sich Methoden, untersuchte Zeckenarten und Lebensstadien der Parasiten unterscheiden, ist eine direkte Gegenüberstellung der Prävalenzen mit Vorsicht zu genießen. Es ist häufig beschrieben, dass deutliche Unterschiede in der Prävalenz bei den untersuchten Zecken auftauchen. In unserer Studie reichte die Rickettsienbelastung von 8,6 % bei *I. ricinus* bis 46,3 % bei *D. reticulatus*. Häufig haben *D. reticulatus*-Zecken eine hohe Prävalenz (STAŃCZAK et al. 2018). Beispielsweise hat eine Studie aus Nordostdeutschland eine Prävalenz von 64,0 % in *D. reticulatus*-Zecken bestimmt (KOHN et al. 2019). Die in unserer Studie ermittelte Prävalenz der *I. ricinus*-Zecken stimmt mit vorherig beschriebenen Prävalenzen dieser Zeckenart aus Deutschland überein (SILAGHI et al. 2008, SCHORN et al. 2011, TAPPE und STRUBE 2013). Adulte Zecken zeigten ein statistisch höheres Infektionsrisiko als Nymphen, welche in ihrem Leben erst ein Blutmahl als Larven zu sich genommen haben. Dennoch muss bemerkt werden, dass wir ausschließlich Nymphen der *I. ricinus*-Zecke untersucht haben und keine subadulten Stadien der *D. reticulatus*-Zecke. In einer Studie, welche ebenfalls subadulte Stadien von *D. reticulatus* untersucht hat, wurde der Ansatz geäußert, dass transovarielle Übertragung von Rickettsien in Zecken bei *D. reticulatus*-

Zecken eine größere Rolle spielt im Vergleich zu *I. ricinus*-Zecken. In dieser Studie wurden die untersuchten Zecken von Wirten abgesammelt (OBIEGALA et al. 2016). In einer anderen Studie konnten ungewöhnlicherweise 47 Larven und zwei Nymphen von *D. reticulatus* in der Vegetation durch die Flaggenmethode gefunden werden. Die Larven wurden gepoolt getestet und zeigten eine minimale Infektionsrate von 42,2 %. Alle Proben wurden als *R. raoultii* identifiziert (SCHMUCK et al. 2020). Die erfolgreichen Übertragungsraten von *R. raoultii* in *D. reticulatus* wurden für die transovarielle Übertragung mit 90,0 % und für die transstadiale Übertragung mit 98,0 % beschrieben (SAMOYLENKO et al. 2009). Da subadulte Stadien von *D. reticulatus* so selten durch die Flaggenmethode zu sammeln sind, wären weitere Studien wichtig, um diesem Ansatz nachzugehen.

Nur *I. ricinus* betrachtend, hatten die adulten Zecken ebenfalls ein höheres Infektionsrisiko als die Nymphen. Dies wurde in den meisten, wenn auch nicht in allen Studien beobachtet, die alleinig diese Zeckenart untersuchten (HILDEBRANDT et al. 2010, SCHORN et al. 2011, KNOLL et al. 2021b).

Im Frühjahr und im Sommer waren die Zecken signifikant häufiger mit Rickettsien infiziert als im Herbst. Zwischen Frühjahr und Sommer konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. In unserer statistischen Analyse, welche ausschließlich *I. ricinus*-Zecken untersucht, konnte kein saisonaler Einfluss festgestellt werden. In anderen Studien sind saisonale Einflüsse unterschiedlich beschrieben, es lässt sich kein gesamtheitliches Muster bestimmen. In zwei Studien aus Nordwestdeutschland waren Zecken, welche im Sommer und Herbst gesammelt wurden, signifikant häufiger mit Rickettsien infiziert als solche, die im Frühjahr gesammelt wurden (MAY und STRUBE 2014, BLAZEJAK et al. 2017). In einer Studie aus Bayern wurden im Vergleich zu Frühjahr und Herbst, die meisten infizierten Zecken im Sommer gesammelt (SCHORN et al. 2011). Im Gegensatz dazu beschreibt eine Studie aus Dänemark mehr infizierte Zecken, welche im Frühjahr gesammelt wurden als in Sommer und Herbst (KANTSØ et al. 2010). Eine Studie aus Norddeutschland beschreibt am seltensten infizierte Zecken im August verglichen mit allen anderen untersuchten Monaten (KNOLL et al. 2021b). Eine Studie aus Nordostdeutschland, welche ausschließlich *D. reticulatus* untersuchte, konnte keinen saisonalen Einfluss auf die Rickettsienprävalenz feststellen (KOHN et al. 2019).

In unserer Studie hat das Habitat die Infektionswahrscheinlichkeit von Zecken mit Rickettsien nicht beeinflusst. Andere europäische Studien aus der Slowakei, Luxemburg und Deutschland, in welchen die Rickettsienprävalenz in *I. ricinus*-Zecken aus verschiedenen Landschaftstypen

untersucht wurden, konnten ebenfalls keinen statistischen Effekt erkennen (REYE et al. 2010, ŠPITALSKÁ et al. 2014, KNOLL et al. 2021b). Es scheint, als würden mikroklimatische Faktoren eine wichtigere Rolle für die Rickettsienprävalenz in Zecken spielen als das Habitat an sich. Ein Studienmodell, welches mikroklimatische Faktoren in den experimentellen Aufbau und die Feldversuche mit einbezieht, könnte sehr hilfreich sein, um weitere, die Zeckeninfektion begünstigende, Faktoren auszumachen.

Die Anzahl der Ko-Infektionen mit Rickettsien als auch Borrelien waren in den Kleinsäugetieren niedrig. Lediglich die Spitzmaus *S. araneus* zeigte eine abweichende Prävalenz von 10,0 %. Es existieren nur wenige Studien, welche den Zusammenhang der Ko-Infektionen dieser beiden Bakterien in Kleinsäugetieren untersuchen. Da *S. araneus* in unserer Studie die einzige Kleinsäugetierart mit einer hohen Ko-Infektionsrate war und in vorherigen Studien selten Beachtung fand, sollten Überlegungen über zukünftige Projekte, welche diese Spezies mehr in den Fokus stellen, angestellt werden. Die Ko-Infektionsrate von Rickettsien und Borrelien in Zecken war in unserer Studie gering. Eine vorherige Studie konnte allerdings eine positive Korrelation der beiden Infektionen feststellen (RAULF et al. 2018). Eine andere Studie, in welcher die untersuchten Zecken bei beiden Bakterien eine höhere Prävalenz zeigten, wies diesen positiven Zusammenhang nicht nach (KNOLL et al. 2021a). Der einzige in unserer Studie festgestellte Effekt war eine leichte Tendenz von einer negativen Assoziation von einer Rickettsieninfektion mit einer Borrelieninfektion bei Zecken, welche im Frühjahr gesammelt wurden.

In unserer Studie konnten 68,8 % der Zeckenproben, die positiv in der qPCR waren, mithilfe der konventionellen PCR amplifiziert, danach sequenziert und identifiziert werden. Jede Probe konnte entweder als *R. helvetica* oder *R. raoultii* ausgemacht werden. In Deutschland ist *R. helvetica* die am meisten verbreitete Rickettsienart in Zecken. Dabei ist zu bedenken, dass sie durch die weite Verbreitung und intensiven Untersuchungen ihrer assoziierten Zeckenart *I. ricinus* dementsprechend häufiger nachgewiesen wird als Rickettsienarten, die mit anderen Zeckenarten assoziiert sind. Auch in unserer Studie kam *R. helvetica* am häufigsten vor. Interessanterweise war sie die einzige bei *I. ricinus*-Zecken nachgewiesene Art, wenngleich *R. monacensis* nicht selten in Deutschland ist. Dennoch scheint letztere vor allem im süddeutschen Raum verbreiteter (SILAGHI et al. 2008, SCHORN et al. 2011, BLAZEJAK et al. 2017, KNOLL et al. 2021b). Die *R. helvetica*-Sequenzen, die in unserer Studie gefunden wurden, waren identisch mit denen, welche in einer *I. persulcatus*-Zecke in Russland und einer

I. ricinus-Zecke in Deutschland gefunden wurden (KARTASHOV et al. 2017, SPECK et al. 2018). Alle *R. raoultii*-Sequenzen unserer Studie wurden vorher in China detektiert. Verglichen mit anderen Zeckenarten, hat *R. raoultii* eine starke Assoziation mit *D. reticulatus* und war ebenfalls die einzige Rickettsienspezies, welche wir in unserer Studie in *D. reticulatus* nachweisen konnten (PAROLA et al. 2013). Da *I. ricinus* und *D. reticulatus* die zwei häufigsten Zeckenarten in Mitteleuropa sind, ist ihr Monitoring ein wichtiges Werkzeug, um mehr Wissen über die Risikofaktoren für humane und tierische Infektionen zu erlangen.

5 Zusammenfassung

Charlotte Arz

Einfluss von Umwelt- und individuellen Faktoren auf die Prävalenz von *Rickettsia* spp. in Kleinsäugetern und Zecken

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen

Eingereicht im November 2023

51 Seiten, 1 Abbildung, 1 Tabelle, 1 Publikation, 145 Literaturangaben

Schlüsselwörter: *Ixodes*, *Dermacentor*, Habitat, Grasland, Wald, *Apodemus*, *Rickettsia*

Einleitung

Die am häufigsten vorkommenden Zeckenarten in Deutschland sind der gemeine Holzbock (*Ixodes ricinus*) und die Auwaldzecke (*Dermacentor reticulatus*). Für beide Arten fungieren Kleinsäugeter als Wirte für die subadulten Stadien und bestimmen so ihr gemeinsames Vorkommen in den Habitaten der Wirtstiere. Zecken sind die Hauptüberträger von Rickettsien der Zeckenstichfiebergruppe. Die in Deutschland vorkommenden Rickettsienarten *Rickettsia helvetica* und *Rickettsia raoultii* wurden mit Erkrankungen des Menschen in Verbindung gebracht.

Ziele der Untersuchung

Untersuchungen über den Einfluss von umweltassoziierten und individuellen Faktoren auf die Rickettsienprävalenz in Zecken und Kleinsäugetern sind rar. Aufgrund dessen war es Ziel dieser Studie, die Prävalenz von Rickettsien in Zecken und Kleinsäugetern nicht nur in Bezug auf Spezies und Saison zu untersuchen, sondern auch verschiedene Habitatstrukturen zu betrachten. Zusätzlich wurden Daten zu Ko-Infektionen der beiden Bakteriengattungen Rickettsien und Borrelien in Zecken und Kleinsäugetern erhoben.

Tiere, Material und Methoden

Untersucht wurden den Hainich-Dün Nationalpark in Thüringen umschließende Gebiete. Insgesamt standen DNA-Proben von 1167 Kleinsäugeterohrsegmenten (zehn Spezies; Frühjahr und Sommer 2017-19) und 1098 Zecken (zwei Spezies; Frühjahr, Sommer, und Herbst 2018 und 2019) zur Verfügung. Die Untersuchungsstellen wurden dabei für Kleinsäugeter in die Habitate Waldgebiet und Grasland und für Zecken in die Habitate Waldgebiet und angrenzender Ökoton zwischen Waldgebiet und Grasland eingeteilt. Die DNA-Proben wurden mittels einer quantitativen real-time PCR auf das Vorhandensein des *gltA* Gens von Rickettsien untersucht. Positive Proben wurden mithilfe einer das *ompB* Gen detektierenden

konventionellen PCR auf *Rickettsia*-Speziesebene durch anschließende Sanger Sequenzierung charakterisiert. Die statistische Auswertung umfasste die Errechnung von Konfidenzintervallen (95 % KI) und die Erstellung mehrerer linear gemischter generalisierter Modelle (GLMM).

Ergebnisse

Rickettsia-DNA wurde in 11,4 % (n=125) der Zecken gefunden. Innerhalb der *I. ricinus* Zecken (8,6 %; 88/1018) war die *Rickettsia*-Prävalenz niedriger als in *D. reticulatus* Zecken (46,3 %; 37/80) (GLMM: $p < 0,001$). Im Herbst gesammelte Zecken waren signifikant häufiger *Rickettsia*-positiv als Zecken aus dem Frühjahr und Sommer (GLMM: jeweils $p < 0,001$). Das Habitat hatte keinen Einfluss auf die Infektionswahrscheinlichkeit der Zecken (GLMM: $p = 0,7109$). Adulte Zecken waren signifikant häufiger *Rickettsia*-positiv als Nymphen (GLMM: $p = 0,0199$). Es wurden 87 *Rickettsia*-positive Zeckenproben auf Spezieslevel bestimmt. Alle 75 *I. ricinus* Zecken konnten als *R. helvetica* und alle 12 *D. reticulatus* Zecken konnten als *R. raoultii* bestimmt werden.

In 9,9 % (n=115) der Kleinsäuger (8/10 Arten: *Microtus arvalis*, *Microtus agrestis*, *Clethrionomys glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus*, *Apodemus agrarius*, *Sorex araneus*, *Sorex minutus*) konnte *Rickettsia*-DNA detektiert werden. Tiere aus den Waldgebieten waren häufiger *Rickettsia*-positiv als Tiere aus dem Grasland (GLMM: $p < 0,001$). Der Faktor Saison hatte keinen Einfluss auf die Infektionswahrscheinlichkeit (GLMM: $p = 0,1062$). Die *Rickettsia*-Spezies konnte ausschließlich in Proben zweier *A. flavicollis* als *R. helvetica* identifiziert werden.

Die Zahlen der Ko-Infektionen waren bei Zecken (0,8 %) und Kleinsäufern (0,8 %) gering. Lediglich *S. araneus* zeigte eine vergleichsweise hohe Ko-Infektionsrate (10,0 %; 2/20).

Schlussfolgerung

Die detektierte *Rickettsia*-Prävalenz in Kleinsäufern und Zecken deckt sich jeweils mit den Prävalenzen voriger Studien aus Deutschland. Interessanterweise beeinflusste das Habitat (höher im Wald als im Grasland) ausschließlich die Prävalenz innerhalb der untersuchten Kleinsäugerpopulation, nicht jedoch die Prävalenz innerhalb der untersuchten Zecken. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die hohe Prävalenz der vermehrt im Wald gefangenen Arten *A. flavicollis* und *A. sylvaticus* sein. *Rickettsia helvetica* und *R. raoultii* wurden jeweils ausschließlich in ihren assoziierten Zeckenspezies detektiert.

6 Summary

Charlotte Arz

Influence of environmental and individual factors on prevalence of *Rickettsia* spp. in small mammals and ticks

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health

Submitted in November 2023

51 pages, 1 figure, 1 table, 1 publication, 145 references

Keywords: *Ixodes*, *Dermacentor*, habitat, grassland, forest, *Apodemus*, *Rickettsia*

Introduction

The two most common tick species in Germany are the castor bean tick (*Ixodes ricinus*) and the ornate dog tick (*Dermacentor reticulatus*). Small mammals serve as hosts for immature life stages of both species and thus are responsible for their occurrence in the habitats of the hosts. Ticks are the main vectors of the *Rickettsia* spp. of the Spotted Fever Group. In Germany occurring species *Rickettsia helvetica* and *Rickettsia raoultii* are linked to illnesses in humans.

Aim of the study

Studies about the influence of environmental and individual factors on *Rickettsia* prevalence in ticks and small mammals are scarce. For this reason, the aim of this study was to analyse the prevalence of *Rickettsia* in ticks and small mammals not only regarding their species and season, but also considering different habitats. Additionally, data of co-infections with the two bacteria *Rickettsia* spp. and *Borrelia* spp. in ticks and small mammals were collected.

Animals, Material and Methods

Study regions were areas surrounding the Hainich-Dün Nationalpark in Thuringia, Middle Germany. Overall, DNA samples of 1167 small mammal ear snips (ten species; spring and summer 2017-19) and 1098 ticks (two species; spring, summer, and autumn 2018 and 2019) were available. The investigated areas for small mammals were divided in habitat of forest and grassland, the ones for ticks were divided in habitat of forest and the bordering ecotone between forest and grassland. The DNA samples were first screened by a quantitative real time PCR targeting the *gltA* gene of *Rickettsia* spp.. Positive samples were then tested by a conventional PCR targeting the *ompB* gene. Through following sanger sequencing *Rickettsia* species were identified. Statistical tests included determining confidence intervals (95% CI) and computing multiple general linear mixed models.

Results

In ticks, DNA of *Rickettsia* was found with a prevalence of 11.4 % (n=125). Ticks of *I. ricinus* (8.6 %; 88/1018) showed a lower prevalence than *D. reticulatus* ticks (46.3 %; 37/80) (GLMM: $p < 0.001$). Ticks collected in autumn were significantly more often carriers of *Rickettsia* DNA than ticks collected in spring and summer (GLMM: both $p < 0.001$). Habitat had no influence on infection probability in ticks (GLMM: $p = 0.7109$). Adult ticks were significantly more often recorded with *Rickettsia* DNA than nymphs (GLMM: $p = 0.0199$). 87 tick samples were positive in the conventional PCR and were sequenced: 75 samples of *I. ricinus* complex could be identified as *R. helvetica* and 12 samples of *D. reticulatus* could be identified as *R. raoultii*.

In small mammals DNA of *Rickettsia* could be detected with a prevalence of 9.9 % (n=115) (8/10 species: *Microtus arvalis*, *Microtus agrestis*, *Clethrionomys glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus*, *Apodemus agrarius*, *Sorex araneus*, *Sorex minutus*). Animals from forest were more often carriers of *Rickettsia* DNA than animals from grassland (GLMM: $p < 0.001$). Season didn't influence infection probability (GLMM: $p = 0.1062$). Characterisation on species level could only be achieved in two samples of *A. flavicollis*. Both could be identified as *R. helvetica*.

Numbers of co-infections were low in both ticks (0.8 %) and small mammals (0.8 %). Solely *S. araneus* showed a comparably high co-infection rate (10.0 %; 2/20).

Conclusion

The *Rickettsia* prevalence in ticks and small mammals determined in this study falls in line with previous studies from Germany. Interestingly, habitat type did not influence the prevalence of *Rickettsia* in ticks but in small mammals, which were significantly more often infected in forest than in grassland. A possible explanation may be the high prevalence in animals of the species *A. flavicollis* and *A. sylvaticus*, which were more abundant in the forest. Both *R. helvetica* and *R. raoultii* were exclusively detected in their respective tick species.

7 Anhang/Referenzen

7.1 Literaturverzeichnis

- Abdad MY, Abou Abdallah R, Fournier PE, Stenos J, Vasoo S. A Concise Review of the Epidemiology and Diagnostics of Rickettsioses: *Rickettsia* and *Orientia* spp. J Clin Microbiol. 2018; 56(8): e01728-17.
- Akram SM, Jamil RT, Gossman W. *Rickettsia Akari* (Rickettsialpox). 2023 (zitiert vom 09.11.2023). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448081/>>.
- Apanaskevich DA, Oliver J, Sonenshine D, Roe R. Life cycles and natural history of ticks. Biology of ticks. 2013; 1: 59-73.
- Aulagnier S, Haffner P, Mitchell-Jones AJ, Moutou F, Zima J. Die Säugetiere Europas, Nordafrikas und Vorderasiens Der Bestimmungsführer. 1. Aufl. Göttingen: Haupt Verlag Bern Stuttgart Wien; 2008.
- Avšič-Županc T, Saksida A, Korva M. Hantavirus infections. Clin Microbiol Infect. 2019; 21s: e6-e16.
- Azad AF, Beard CB. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. Emerg Infect Dis. 1998; 4(2): 179-86.
- Azagi T, Hoornstra D, Kremer K, Hovius JWR, Sprong H. Evaluation of Disease Causality of Rare *Ixodes ricinus*-Borne Infections in Europe. Pathogens. 2020; 9(2): 150.
- Blanton LS. The Rickettsioses: A Practical Update. Infect Dis Clin North Am. 2019; 33(1): 213-29.
- 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(1): 588.
- Bogdan C. Rickettsiaceae (*Rickettsia*, *Orientia*), Anaplasmataceae (*Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*) und Coxiellaceae. In: Suerbaum S, Hahn H, Burchard G, Kaufmann S und TF Ss, Hrsg. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer, Berlin, Heidelberg: Springer-Lehrbuch; 2012. p. 383-91.
- Boulanger N, Boyer P, Talagrand-Reboul E, Hansmann Y. Ticks and tick-borne diseases. Med Mal Infect. 2019; 49(2): 87-97.
- Bown KJ, Lambin X, Telford G, Heyder-Bruckner D, Ogden NH, Birtles RJ. The common shrew (*Sorex araneus*): a neglected host of tick-borne infections? Vector Borne Zoonotic Dis. 2011; 11(7): 947-53.
- Boyard C, Vourc'h G, Barnouin J. The relationships between *Ixodes ricinus* and small mammal species at the woodland-pasture interface. Exp Appl Acarol. 2008; 44(1): 61-76.

- Brandenburg PJ, Obiegala A, Schmuck HM, Dobler G, Chitimia-Dobler L, Pfeffer M. Seroprevalence of Tick-Borne Encephalitis (TBE) Virus Antibodies in Wild Rodents from Two Natural TBE Foci in Bavaria, Germany. *Pathogens*. 2023; 12(2): 185.
- Brown LD, Macaluso KR. *Rickettsia felis*, an Emerging Flea-Borne Rickettsiosis. *Curr Trop Med Rep*. 2016; 3: 27-39.
- Buczek W, Koman-Ižko A, Buczek AM, Buczek A, Bartosik K, Kulina D, Ciura D. Spotted fever group rickettsiae transmitted by *Dermacentor* ticks and determinants of their spread in Europe. *Ann Agric Environ Med*. 2020; 27(4): 505-11.
- Burgdorfer W, Aeschlimann A, Peter O, Hayes SF, Philip RN. *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. *Acta Trop*. 1979; 36(4): 357-67.
- Burri C, Schumann O, Schumann C, Gern L. Are *Apodemus* spp. mice and *Myodes glareolus* reservoirs for *Borrelia miyamotoi*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, *Rickettsia helvetica*, *R. monacensis* and *Anaplasma phagocytophilum*? *Ticks Tick Borne Dis*. 2014; 5(3): 245-51.
- Černý J, Lynn G, Hrnková J, Golovchenko M, Rudenko N, Grubhoffer L. Management Options for *Ixodes ricinus*-Associated Pathogens: A Review of Prevention Strategies. *Int J Environ Res Public Health*. 2020; 17(6): 1830.
- Chang QC, Hu Y, Wu TT, Ma XX, Jiang BG, Jia N, Wang AQ, Jiang JF. The Role of Ranged Horses in Eco-Epidemiology of *Rickettsia raoultii* Infection in China. *Front Microbiol*. 2021; 12: 795500.
- Chitimia-Dobler L, Bestehorn M, Bröker M, Borde J, Molcanyi T, Andersen NS, Pfeffer M, Dobler G. Morphological anomalies in *Ixodes ricinus* and *Ixodes inopinatus* collected from tick-borne encephalitis natural foci in Central Europe. *Exp Appl Acarol*. 2017; 72(4): 379-97.
- Deplazes P, Eckert J, von Samson-Himmelstjerna G, Zahner H. 14.1.1 Ordnung Metastigmata (Ixodida, Zecken). In: Deplazes P, Eckert J, von Samson-Himmelstjerna G und Zahner Hs, Hrsg. *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. 3. Aufl. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag; 2013. p. 377-401.
- Dobler G, Gniel D, Petermann R, Pfeffer M. Epidemiology and distribution of tick-borne encephalitis. *Wien Med Wochenschr*. 2012; 162(11-12): 230-8.
- Dobler G, Pfeffer M. Spotted Fever Rickettsiae and Rickettsioses in Germany. In: Mehlhorn Hs, Hrsg. *Arthropods as Vectors of Emerging Diseases*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 361-76.
- Dobler G, Wölfel R. Typhus and other rickettsioses: emerging infections in Germany. *Dtsch Arztebl Int*. 2009; 106(20): 348-54.
- Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev*. 2004; 17(1): 107-35.
- Eremeeva ME, Dasch GA. Challenges posed by tick-borne rickettsiae: eco-epidemiology and public health implications. *Front Public Health*. 2015; 3: 55.

- Estrada-Peña A, Nava S, Petney T. Description of all the stages of *Ixodes inopinatus* n. sp. (Acari: Ixodidae). *Ticks Tick Borne Dis.* 2014; 5(6): 734-43.
- Fischer S, Spierling NG, Heuser E, Kling C, Schmidt S, Rosenfeld UM, Reil D, Imholt C, Jacob J, Ulrich RG, Essbauer S. High prevalence of *Rickettsia helvetica* in wild small mammal populations in Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018; 9(3): 500-5.
- Foissac M, Socolovschi C, Raoult D. Update on SENLAT syndrome: scalp eschar and neck lymph adenopathy after a tick bite. *Ann Dermatol Venereol.* 2013; 140(10): 598-609.
- Földvári G, Široký P, Szekeres S, Majoros G, Sprong H. *Dermacentor reticulatus*: a vector on the rise. *Parasit Vectors.* 2016; 9(1): 314.
- Franke J, Hildebrandt A, Meier F, Straube E, Dorn W. Prevalence of Lyme disease agents and several emerging pathogens in questing ticks from the German Baltic coast. *J Med Entomol.* 2011; 48(2): 441-4.
- Galfsky D, Król N, Pfeffer M, Obiegala A. Long-term trends of tick-borne pathogens in regard to small mammal and tick populations from Saxony, Germany. *Parasit Vectors.* 2019; 12(1): 131.
- Gern L, Estrada-Pena A, Frandsen F, Gray J, Jaenson T, Jongejan F, Kahl O, Korenberg E, Mehl R, Nuttall P. European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentralblatt für bakteriologie.* 1998; 287(3): 196-204.
- Gern L, Rais O. Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between co-feeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol.* 1996; 33(1): 189-92.
- Gray J, Kahl O, Zintl A. What do we still need to know about *Ixodes ricinus*? *Ticks Tick Borne Dis.* 2021; 12(3): 101682.
- Gray JS, Estrada-Peña A, Vial L. Ecology of nidicolous ticks. In: Sonenshine D und Roe Rs, Hrsg. *Biology of ticks.* 2. Aufl. New York: Oxford University Press; 2014. p. 39-60.
- Guccione C, Colomba C, Tolomeo M, Trizzino M, Iaria C, Cascio A. Rickettsiales in Italy. *Pathogens.* 2021; 10(2): 181.
- Haring V, Jacob J, Walther B, Trost M, Stubbe M, Mertens-Scholz K, Melzer F, Scuda N, Gentil M, Sixl W, Schäfer T, Stanko M, Wolf R, Pfeffer M, Ulrich RG, Obiegala A. White-Toothed Shrews (Genus *Crocidura*): Potential Reservoirs for Zoonotic *Leptospira* spp. and Arthropod-Borne Pathogens? *Pathogens.* 2023; 12(6): 781.
- Hauer S, Ansorge H, Zöphel U. *Atlas der Säugetiere Sachsens : Naturschutz und Landschaftspflege.* Dresden: Zentraler Broschürenversand der Sächsischen Staatsregierung: Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landschaft und Geologie; 2009.
- Heglasová I, Víchová B, Stanko M. Detection of *Rickettsia* spp. in Fleas Collected from Small Mammals in Slovakia, Central Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2020; 20(9): 652-6.

- Hildebrand J, Percec-Matysiak A, Popiołek M, Merta D, Myśliwy I, Buńkowska-Gawlik K. A molecular survey of spotted fever group rickettsiae in introduced raccoons (*Procyon lotor*). *Parasit Vectors*. 2022; 15(1): 162.
- Hildebrandt A, Krämer A, Sachse S, Straube E. Detection of *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia). *Ticks Tick Borne Dis*. 2010; 1(1): 52-6.
- Hofmann J, Kramer S, Herrlinger KR, Jeske K, Kuhns M, Weiss S, Ulrich RG, Krüger DH. Tula Virus as Causative Agent of Hantavirus Disease in Immunocompetent Person, Germany. *Emerg Infect Dis*. 2021; 27(4): 1234-7.
- Holmberg M, Mills JN, McGill S, Benjamin G, Ellis BA. Bartonella infection in sylvatic small mammals of central Sweden. *Epidemiol Infect*. 2003; 130(1): 149-57.
- Hornok S. *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794). In: Estrada-Peña A, Mihalca AD und Petney TNs, Hrsg. *Ticks of Europe and North Africa*. 1. Aufl. Cham: Springer International Publishing AG; 2017. p. 287-91.
- Hotopp I, Walther B, Fuelling O, Reil D, Hesse C, Below DA, Imholt C, Jacob J. Habitat and Season Effects on Small Mammal Bycatch in Live Trapping. *Biology (Basel)*. 2022; 11(12): 1806.
- Hvidsten D, Stuen S, Jenkins A, Dienus O, Olsen RS, Kristiansen BE, Mehl R, Matussek A. *Ixodes ricinus* and *Borrelia* prevalence at the Arctic Circle in Norway. *Ticks Tick Borne Dis*. 2014; 5(2): 107-12.
- Jeffries CL, Mansfield KL, Phipps LP, Wakeley PR, Mearns R, Schock A, Bell S, Breed AC, Fooks AR, Johnson N. Louping ill virus: an endemic tick-borne disease of Great Britain. *J Gen Virol*. 2014; 95(Pt 5): 1005-14.
- Jeske K, Jacob J, Drewes S, Pfeffer M, Heckel G, Ulrich RG, Imholt C. Hantavirus-*Leptospira* coinfections in small mammals from central Germany. *Epidemiol Infect*. 2021; 149: e97.
- Kahl O, Gray JS. The biology of *Ixodes ricinus* with emphasis on its ecology. *Ticks Tick Borne Dis*. 2023; 14(2): 102114.
- Kantsø B, Svendsen CB, Jensen PM, Vennestrøm J, Krogfelt KA. Seasonal and habitat variation in the prevalence of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks from Denmark. *Ticks Tick Borne Dis*. 2010; 1(2): 101-3.
- Karbowiak G. Zoonotic reservoir of *Babesia microti* in Poland. *Pol J Microbiol*. 2004; 53 Suppl: 61-5.
- Karbowiak G, Biernat B. The role of particular tick developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens affecting humans in Central Europe. 2. Tick-borne encephalitis virus. *Ann Parasitol*. 2016; 62(1): 3-9.
- Karbowiak G, Biernat B, Stańczak J, Szewczyk T, Werszko J. The role of particular tick developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens affecting humans in Central Europe. 3. Rickettsiae. *Ann Parasitol*. 2016; 62(2): 89-100.

- Kartashov MY, Glushkova LI, Mikryukova TP, Korabelnikov IV, Egorova YI, Tupota NL, Protopopova EV, Konovalova SN, Ternovoi VA, Loktev VB. Detection of *Rickettsia helvetica* and *Candidatus R. tarasevichiae* DNA in *Ixodes persulcatus* ticks collected in Northeastern European Russia (Komi Republic). *Ticks Tick Borne Dis.* 2017; 8(4): 588-92.
- Kiffner C, Lödige C, Alings M, Vor T, Rühle F. Attachment site selection of ticks on roe deer, *Capreolus capreolus*. *Exp Appl Acarol.* 2011; 53(1): 79-94.
- Kim HK. Rickettsia-host-tick interactions: Knowledge advances and gaps. *Infect Immun.* 2022; 90(9): e00621-21.
- Kingry LC, Petersen JM. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4: 35.
- Knoll S, Springer A, Hauck D, Schunack B, Pachnicke S, Fingerle V, Strube C. Distribution of *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes* tick populations in Northern Germany, co-infections with Rickettsiales and assessment of potential influencing factors. *Med Vet Entomol.* 2021a; 35(4): 595-606.
- Knoll S, Springer A, Hauck D, Schunack B, Pachnicke S, Strube C. Regional, seasonal, biennial and landscape-associated distribution of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. infections in *Ixodes* ticks in northern Germany and implications for risk assessment at larger spatial scales. *Ticks Tick Borne Dis.* 2021b; 12(3): 101657.
- Kohn M, Krücken J, McKay-Demeler J, Pachnicke S, Krieger K, von Samson-Himmelstjerna G. *Dermacentor reticulatus* in Berlin/Brandenburg (Germany): Activity patterns and associated pathogens. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019; 10(1): 191-206.
- Krawczyk AI, van Duijvendijk GLA, Swart A, Heylen D, Jaarsma RI, Jacobs FHH, Fonville M, Sprong H, Takken W. Effect of rodent density on tick and tick-borne pathogen populations: consequences for infectious disease risk. *Parasit Vectors.* 2020; 13(1): 34.
- Król N, Obiegala A, Imholt C, Arz C, Schmidt E, Jeske K, Ulrich RG, Rentería-Solís Z, Jacob J, Pfeffer M. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks and small mammals from different habitats. *Parasit Vectors.* 2022; 15(1): 195.
- Labuda M, Jones LD, Williams T, Danielova V, Nuttall PA. Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between co-feeding ticks. *J Med Entomol.* 1993; 30(1): 295-9.
- Lamas C, Curi A, Bóia M, Lemos E. Human bartonellosis: seroepidemiological and clinical features with an emphasis on data from Brazil - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103(3): 221-35.
- Laukaitis HJ, Macaluso KR. Unpacking the intricacies of *Rickettsia*-vector interactions. *Trends Parasitol.* 2021; 37(8): 734-46.
- Lebecque O, Dupont M. Puumala hantavirus: an imaging review. *Acta Radiol.* 2020; 61(8): 1072-9.
- Li H, Zhang PH, Du J, Yang ZD, Cui N, Xing B, Zhang XA, Liu W. *Rickettsia japonica* Infections in Humans, Xinyang, China, 2014-2017. *Emerg Infect Dis.* 2019; 25(9): 1719-22.

- Liu G, Zhao S, Tan W, Hornok S, Yuan W, Mi L, Wang S, Liu Z, Zhang Y, Hazihan W, Gu X, Wang Y. Rickettsiae in red fox (*Vulpes vulpes*), marbled polecat (*Vormela peregusna*) and their ticks in northwestern China. *Parasit Vectors*. 2021; 14(1): 204.
- Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, Stephenson JR, Fooks AR, Solomon T. Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *J Gen Virol*. 2009; 90(Pt 8): 1781-94.
- Mansueto P, Vitale G, Cascio A, Seidita A, Pepe I, Carroccio A, di Rosa S, Rini GB, Cillari E, Walker DH. New insight into immunity and immunopathology of Rickettsial diseases. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012: 967852.
- Mardosaitė-Busaitienė D, Radzijeuskaja J, Balčiauskas L, Paulauskas A. First detection of *Rickettsia helvetica* in small mammals in Lithuania. *New Microbes New Infect*. 2018; 22: 19-23.
- Martello E, Mannelli A, Grego E, Ceballos LA, Ragagli C, Stella MC, Tomassone L. *Borrelia burgdorferi* sensu lato and spotted fever group rickettsiae in small rodents and attached ticks in the Northern Apennines, Italy. *Ticks Tick Borne Dis*. 2019; 10(4): 862-7.
- May K, Strube C. Prevalence of Rickettsiales (*Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp.) in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the city of Hamburg, Germany. *Parasitol Res*. 2014; 113(6): 2169-75.
- Mazhetese E, Magaia V, Taviani E, Neves L, Morar-Leather D. *Rickettsia africae*: identifying gaps in the current knowledge on vector-pathogen-host interactions. *J Infect Dev Ctries*. 2021; 15(8): 1039-47.
- Mediannikov O, Matsumoto K, Samoilenko I, Drancourt M, Roux V, Rydkina E, Davoust B, Tarasevich I, Brouqui P, Fournier P-E. *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008; 58(7): 1635-9.
- Medlock J, Hansford K, Vaux A, Cull B, Abdullah S, Pietzsch M, Wall R, Johnson N, Phipps L. Distribution of the tick *Dermacentor reticulatus* in the United Kingdom. *Med Vet Entomol*. 2017; 31(3): 281-8.
- Meinig H, Boye P, Dähne M, Hutterer R, Lang J. Rote Liste und Gesamtartenliste der Säugetiere (Mammalia) Deutschlands. - Naturschutz und Biologische Vielfalt. 2020; 170(2): 73.
- Mejlon H, Jaenson TG. Questing behaviour of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol*. 1997; 21: 747-54.
- Mendoza-Roldan JA, Ravindran Santhakumari Manoj R, Latrofa MS, Iatta R, Annoscia G, Lovreglio P, Stufano A, Dantas-Torres F, Davoust B, Laidoudi Y, Mediannikov O, Otranto D. Role of reptiles and associated arthropods in the epidemiology of rickettsioses: A one health paradigm. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021; 15(2): e0009090.
- Merhej V, Raoult D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2011; 86(2): 379-405.

Michelitsch A, Wernike K, Klaus C, Dobler G, Beer M. Exploring the Reservoir Hosts of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Viruses*. 2019; 11(7): 669.

Miřková K, Berthová L, Kalúz S, Kazimírová M, Burdová L, Kocianová E. First detections of *Rickettsia helvetica* and *R. monacensis* in ectoparasitic mites (Laelapidae and Trombiculidae) infesting rodents in south-western Slovakia. *Parasitol Res*. 2015; 114(7): 2465-72.

Mysterud A, Byrkjeland R, Qviller L, Viljugrein H. The generalist tick *Ixodes ricinus* and the specialist tick *Ixodes trianguliceps* on shrews and rodents in a northern forest ecosystem--a role of body size even among small hosts. *Parasit Vectors*. 2015; 8: 639.

Nilsson K. Septicaemia with *Rickettsia helvetica* in a patient with acute febrile illness, rash and myasthenia. *J Infect*. 2009; 58(1): 79-82.

Nowak-Chmura M, Siuda K. Ticks of Poland. Review of contemporary issues and latest research. *Ann Parasitol*. 2012; 58(3): 125-55.

Obiegala A, Król N, Oltersdorf C, Nader J, Pfeffer M. The enzootic life-cycle of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) and tick-borne rickettsiae: an epidemiological study on wild-living small mammals and their ticks from Saxony, Germany. *Parasit Vectors*. 2017; 10(1): 115.

Obiegala A, Oltersdorf C, Silaghi C, Kiefer D, Kiefer M, Woll D, Pfeffer M. *Rickettsia* spp. in small mammals and their parasitizing ectoparasites from Saxony, Germany. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. 2016; 5: 19-24.

Obiegala A, Pfeffer M, Kiefer D, Kiefer M, Król N, Silaghi C. *Bartonella* spp. in small mammals and their fleas in differently structured habitats from Germany. *Front Vet Sci*. 2021; 7: 625641.

Oliver Jr JH. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). *Annual review of Ecology and Systematics*. 1989; 20(1): 397-430.

Otranto D, Dantas-Torres F, Santos-Silva MM. *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758). In: Estrada-Peña A, Mihalca AD und Petney TNs, Hrsg. *Ticks of Europe and North Africa*. 1. Aufl. Cham: Springer International Publishing AG; 2017. p. 189-95.

Parola P. *Rickettsia felis*: from a rare disease in the USA to a common cause of fever in sub-Saharan Africa. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17(7): 996-1000.

Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, Abdad MY, Stenos J, Bitam I, Fournier PE, Raoult D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev*. 2013; 26(4): 657-702.

Parola P, Rovey C, Rolain JM, Brouqui P, Davoust B, Raoult D. *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in tick-borne Rickettsioses. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15(7): 1105-8.

Perret JL, Guigoz E, Rais O, Gern L. Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasitol Res*. 2000; 86(7): 554-7.

- Petney T, Pfäffle M, Skuballa J. An annotated checklist of the ticks (Acari: Ixodida) of Germany. *Syst Appl Acarol.* 2012; 17: 115-70.
- Petney TN, Pfäffle MP, Sprong H, Mihalca AD, Estrada-Pena A. How to collect ticks and interpret these collections. In: Estrada-Peña A, Mihalca AD und Petney TNs, Hrsg. *Ticks of Europe and North Africa.* 1. Aufl. Cham: Springer International Publishing AG; 2017. p. 5-10.
- Piesman J, Gern L. Lyme borreliosis in europe and north america. *Parasitology.* 2004; 129(S1): 191-220.
- 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.
- Răileanu C, Tauchmann O, Silaghi C. Sympatric occurrence of *Ixodes ricinus* with *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* and the associated tick-borne pathogens near the German Baltic coast. *Parasit Vectors.* 2022; 15(1): 65.
- Randolph SE. Ecology of non-nidicolous ticks. In: Sonenshine D und Roe Rs, Hrsg. *Biology of ticks.* 2. Aufl. New York: Oxford University Press; 2014. p. 3-38.
- Raulf MK, Jordan D, Fingerle V, Strube C. Association of *Borrelia* and *Rickettsia* spp. and bacterial loads in *Ixodes ricinus* ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018; 9(1): 18-24.
- Ravindran R, Hembram PK, Kumar GS, Kumar KGA, Deepa CK, Varghese A. Transovarial transmission of pathogenic protozoa and rickettsial organisms in ticks. *Parasitol Res.* 2023; 122(3): 691-704.
- 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(9): 2923-31.
- Rieg S, Schmoldt S, Theilacker C, de With K, Wölfel S, Kern WV, Dobler G. Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA) acquired in Southwestern Germany. *BMC Infect Dis.* 2011; 11: 167.
- Rizzoli A, Hauffe H, Carpi G, Vourc HG, Neteler M, Rosa R. Lyme borreliosis in Europe. *Euro Surveill.* 2011; 16(27): 19906.
- Rocafort-Ferrer G, Leblond A, Joulié A, René-Martellet M, Sandoz A, Poux V, Pradier S, Barry S, Vial L, Legrand L. Molecular assessment of *Theileria equi* and *Babesia caballi* prevalence in horses and ticks on horses in southeastern France. *Parasitol Res.* 2022; 121(3): 999-1008.
- Rollins RE, Margos G, Brachmann A, Krebs S, Mouchet A, Dingemanse NJ, Laatamna A, Reghaissia N, Fingerle V, Metzler D, Becker NS, Chitimia-Dobler L. German *Ixodes inopinatus* samples may not actually represent this tick species. *Int J Parasitol.* 2023; 53(13): 751-61.
- Romig T, Deplazes P, Jenkins D, Giraudoux P, Massolo A, Craig PS, Wassermann M, Takahashi K, de la Rue M. Ecology and Life Cycle Patterns of *Echinococcus* Species. *Adv Parasitol.* 2017; 95: 213-314.

Rubel F, Brugger K, Chitimia-Dobler L, Dautel H, Meyer-Kayser E, Kahl O. Atlas of ticks (Acari: Argasidae, Ixodidae) in Germany. *Exp Appl Acarol.* 2021; 84(1): 183-214.

Rubel F, Zaenker S, Weigand A, Weber D, Chitimia-Dobler L, Kahl O. Atlas of ticks (Acari: Argasidae, Ixodidae) in Germany: 1st data update. *Exp Appl Acarol.* 2023; 89(2): 251-74.

Samoylenko I, Shpynov S, Raoult D, Rudakov N, Fournier PE. Evaluation of *Dermacentor* species naturally infected with *Rickettsia raoultii*. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15 Suppl 2: 305-6.

Schex S, Dobler G, Riehm J, Müller J, Essbauer S. *Rickettsia* spp. in wild small mammals in Lower Bavaria, South-Eastern Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011; 11(5): 493-502.

Schmidt E, Obiegala A, Imholt C, Drewes S, Saathoff M, Freise J, Runge M, Jacob J, Mayer-Scholl A, Ulrich RG, Pfeffer M. Influence of Season, Population and Individual Characteristics on the Prevalence of *Leptospira* spp. in Bank Voles in North-West Germany. *Biology (Basel).* 2021; 10(9): 933.

Schmuck HM, Chitimia-Dobler L, Król N, Kacza J, Pfeffer M. Collection of immature *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) ticks from vegetation and detection of *Rickettsia raoultii* in them. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020; 11(6): 101543.

Schorn S, Pfister K, Reulen H, Mahling M, Silaghi C. Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Parasit Vectors.* 2011; 4: 135.

Schulz M, Mahling M, Pfister K. Abundance and seasonal activity of questing *Ixodes ricinus* ticks in their natural habitats in southern Germany in 2011. *J Vector Ecol.* 2014; 39(1): 56-65.

Sidorenko M, Radzijeuskaja J, Mickevičius S, Bratčikovienė N, Paulauskas A. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in questing *Dermacentor reticulatus* and *Ixodes ricinus* ticks in Lithuania. *Ticks Tick Borne Dis.* 2021; 12(1): 101594.

Silaghi C, Beck R, Oteo JA, Pfeffer M, Sprong H. Neoehrlichiosis: an emerging tick-borne zoonosis caused by *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. *Exp Appl Acarol.* 2016; 68(3): 279-97.

Silaghi C, Gilles J, Höhle M, Pradel I, Just FT, Fingerle V, Küchenhoff H, Pfister K. Prevalence of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in southern Germany. *J Med Entomol.* 2008; 45(5): 948-55.

Silaghi C, Hamel D, Thiel C, Pfister K, Pfeffer M. Spotted fever group rickettsiae in ticks, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17(5): 890-2.

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

Speck S, Kern T, Aistleitner K, Dilcher M, Dobler G, Essbauer S. In vitro studies of *Rickettsia*-host cell interactions: Confocal laser scanning microscopy of *Rickettsia helvetica*-infected eukaryotic cell lines. PLoS Negl Trop Dis. 2018; 12(2): e0006151.

Špitalská E, Boldiš V, Derdáková M, Selyemová D, Rusňáková Taragel'ová V. Rickettsial infection in *Ixodes ricinus* ticks in urban and natural habitats of Slovakia. Ticks Tick Borne Dis. 2014; 5(2): 161-5.

Sprong H, Wielinga PR, Fonville M, Reusken C, Brandenburg AH, Borgsteede F, Gaasenbeek C, van der Giessen JW. *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. Parasit Vectors. 2009; 2(1): 41.

Stańczak J, Biernat B, Racewicz M, Zalewska M, Matyjasek A. Prevalence of different *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks (Acari: Ixodidae) in north-eastern Poland. Ticks Tick Borne Dis. 2018; 9(2): 427-34.

Stańczak J, Racewicz M, Michalik J, Cieniuch S, Sikora B, Skoracki M. Prevalence of infection with *Rickettsia helvetica* in feeding ticks and their hosts in western Poland. Clin Microbiol Infect. 2009; 15 Suppl 2: 328-9.

Stewart A, Armstrong M, Graves S, Hajkovicz K. *Rickettsia australis* and Queensland Tick Typhus: A Rickettsial Spotted Fever Group Infection in Australia. Am J Trop Med Hyg. 2017; 97(1): 24-9.

Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. *Anaplasma phagocytophilum*--a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. Front Cell Infect Microbiol. 2013; 3: 31.

Svoboda P, Dobler G, Markotić A, Kurolt IC, Speck S, Habuš J, Vucelja M, Krajinović LC, Tadin A, Margaletić J, Essbauer S. Survey for hantaviruses, tick-borne encephalitis virus, and *Rickettsia* spp. in small rodents in Croatia. Vector Borne Zoonotic Dis. 2014; 14(7): 523-30.

Tappe J, Strube C. *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. infections in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the city of Hanover (Germany): Revisited. Ticks Tick Borne Dis. 2013; 4(5): 432-8.

Tilly K, Rosa PA, Stewart PE. Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. Infect Dis Clin North Am. 2008; 22(2): 217-34.

Tołkacz K, Alsarraf M, Kowalec M, Dwużnik D, Grzybek M, Behnke JM, Bajer A. *Bartonella* infections in three species of *Microtus*: prevalence and genetic diversity, vertical transmission and the effect of concurrent *Babesia microti* infection on its success. Parasit Vectors. 2018; 11(1): 491.

Uiterwijk M, Ibáñez-Justicia A, van de Vossenbergh B, Jacobs F, Overgaauw P, Nijssen R, Dabekaussen C, Stroo A, Sprong H. Imported *Hyalomma* ticks in the Netherlands 2018-2020. Parasit Vectors. 2021; 14(1): 244.

Upham N, Burgin C, Widness J, Liphardt S, Parker C, Becker M, Rochon I, Huckaby D. Mammal diversity database. 2023 (zitiert vom 03.11.2023). <<https://doi.org/10.5281/zenodo.7830771>>.

Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist A, Henttonen H, Plyusnin A, Vaheri A. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3(10): 653-61.

Von Blanckenhagen F, Städtler T. Small mammal communities in agricultural landscapes in Germany: review of field data over the last decade. *Julius-Kühn-Archiv.* 2011(432): 75-6.

Walker MD. The hedgehog tick, *Ixodes hexagonus* (Leach, 1815) (Acari: Ixodidae); The natural history and ecology of a nest ectoparasite. *Systematic and Applied Acarology.* 2018; 23(4): 680-714.

Weingart C, Helm CS, Müller E, Schäfer I, Skrodzki M, von Samson-Himmelstjerna G, Krücken J, Kohn B. Autochthonous *Babesia canis* infections in 49 dogs in Germany. *J Vet Intern Med.* 2023; 37(1): 140-9.

Weisser W, Franke AK, Teschke A, Both H, Goedecke B, Ehrhardt M. Exploratorium Hainich-Dün. 2023 (zitiert vom 09.11.2023). <<https://www.biodiversity-exploratories.de/de/regionen/hainich-duen/>>.

Wölfel R, Essbauer S, Dobler G. Diagnostics of tick-borne rickettsioses in Germany: A modern concept for a neglected disease. *Int J Med Microbiol.* 2008; 298: 368-74.

Wongnak P, Bord S, Jacquot M, Agoulon A, Beugnet F, Bournez L, Cèbe N, Chevalier A, Cosson JF, Dambrine N, Hoch T, Huard F, Korboulewsky N, Lebert I, Madouasse A, Mårell A, Moutailler S, Plantard O, Pollet T, Poux V, René-Martellet M, Vayssier-Taussat M, Verheyden H, Vourc'h G, Chalvet-Monfray K. Meteorological and climatic variables predict the phenology of *Ixodes ricinus* nymph activity in France, accounting for habitat heterogeneity. *Sci Rep.* 2022; 12(1): 7833.

Zeroual F, Leulmi H, Bitam I, Benakhla A. Molecular evidence of *Rickettsia slovaca* in spleen of wild boars in northeastern Algeria. *New Microbes New Infect.* 2018; 24: 17-20.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Transmission von zeckenübertragenen Rickettsien der SFG innerhalb des Lebenszyklus von Ixodidae modifiziert nach EREMEEVA und DASCH (2015) (EREMEEVA und DASCH 2015) 1) Oviposition des vollgesogenen Weibchens 2) Larven schlüpfen aus Eiern 3) Larve saugt Blut an Kleinsäugetern 4) vollgesogene Larve häutet sich zur Nymphe 5) Nymphe saugt Blut an Klein- oder Großsäugern 6) Nymphe häutet sich zur adulten Zecke 7) Transovarielle Übertragung 8) Transstadiale Übertragung 9) Übertragung von Rickettsien auf den Menschen durch Nymphe 10) Übertragung von Rickettsien auf den Menschen durch adulte Zecke..... 15

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vektoren, Vorkommen und Symptome von verschiedenen Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe. 16

8 Danksagung

Der allerherzlichste Dank gebührt meiner Betreuerin Anna Obiegala und meinem Doktorvater Martin Pfeffer. Danke für eure Geduld, euren Zuspruch, und eure fachliche Expertise. Außerdem kann ich euch nicht genug für euer Vertrauen in mich danken, auch in Zeiten als ich es selbst nicht hatte. Auch Nina Król möchte ganz besonders für ihre Unterstützung in verschiedensten Belangen und ihre Souveränität danken.

Meine Arbeit wurde nur ermöglicht durch die Zusammenarbeit von verschiedenen Forschungsinstituten. Danke an die Kolleg*innen vom Julius-Kühn Institut für das Bereitstellen der Ohrproben der Kleinsäuger. Vielen Dank für das Datenwälzen für die Statistik an Anna Obiegala und Christian Imholt, der im letzten Moment noch die letzten Statistikrätsel gelöst hat. Vielen Dank an alle Koautor*innen für die Mithilfe und tolle Unterstützung.

Dem gesamten Team des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen möchte ich danken für die schöne Zeit, die ich bei euch verbringen durfte. Ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle Dana Rüster, die für jedes Problem, das auftaucht, eine Lösung parat hat. Außerdem ein großes Danke an Rea und Ari für die wichtigen Päuschen und Ratschläge zwischendurch.

Ein großer Dank geht auch an Raphael, fürs schon immer hinter mir stehen und jetzt im Speziellen fürs Korrekturlesen dieser Arbeit, sowie an meine Eltern, die mich immer unterstützt haben.

Zu guter Letzt ein Riesendank an meine wunderbaren Freund*innen, die mich nie daran zweifeln lassen, dass ich alles schaffen kann.