

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Beurteilung der Humanpathogenität von
Anaplasma phagocytophilum Stämmen
anhand ihrer *drhm* Genpositivität,
Multilocus Sequence Typing (MLST)
und des *ankA*-Genclusters

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Denis Benjamin Langenwalder
aus Freudenstadt

Mainz, 2020

Tag der Promotion: 06. Juli 2021

Meinen lieben Großeltern

Teile dieser Dissertation wurden publiziert (siehe Anhang ab Seite 90):

- I **Langenwalder DB, Schmidt S, Gilli U, Pantchev N, Ganter M, Silaghi C, et al.** Genetic characterization of *Anaplasma phagocytophilum* strains from goats (*Capra aegagrus hircus*) and water buffalo (*Bubalus bubalis*) by 16S rRNA gene, *ankA* gene and multilocus sequence typing. Ticks Tick Borne Dis. 2019;**10**:101267.

- II **Langenwalder DB, Silaghi C, Nieder M, Pfeffer M, von Loewenich FD.** Co-infection, reinfection and superinfection with *Anaplasma phagocytophilum* strains in a cattle herd based on *ankA* gene and multilocus sequence typing. Parasit Vectors, 2020,**13**:157.

- III **Langenwalder DB, Schmidt S, Silaghi C, Skuballa J, Pantchev N, Matei IA, et al.** The absence of the *drhm* gene is not a marker for human-pathogenicity in European *Anaplasma phagocytophilum* strains. Parasit Vectors. 2020;**13**:238.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung und Literaturdiskussion.....	1
1.1 Allgemeine Einführung und geschichtliche Einordnung.....	1
1.2 Taxonomie.....	1
1.3 Epidemiologie	2
1.4 Transmission und Infektionszyklus	3
1.5 Reservoirwirte.....	4
1.6 Pathophysiologie	5
1.7 Humane Granulozytäre Anaplasrose (HGA).....	6
1.8 Diagnostik.....	7
1.9 Präventionsmaßnahmen	8
1.10 Therapie	9
1.11 Molekulargenetische Charakterisierung als Einzelgenanalyse	9
1.12 Multilocus Sequence Typing (MLST).....	11
1.13 <i>drhm</i> Gen und APH_0919/APH_0922 Genlocus	13
1.14 Zielsetzung dieser Arbeit	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	15
2.2 Primer	15
2.3 Geräte	20
2.4 Software	21
2.5 Proben.....	21
2.6 DNA-Präparation aus Blut	31
2.7 DNA-Präparation aus Milzgewebe.....	31
2.8 Amplifikation wirtsspeziesspezifischer DNA	31
2.9 Amplifikation des 16S rRNA Gens.....	34
2.10 Amplifikation der Haushaltsgene	35
2.11 Amplifikation der <i>ankA</i> Genfragmente	36
2.12 Amplifikation des <i>ankA</i> ORF des Clusters 6.....	37
2.13 Amplifikation des <i>ankA</i> ORF des Clusters 7.....	39
2.14 Amplifikation des <i>drhm</i> Gens und des APH_0919/APH_0922 Genlocus	40

2.15	Aufreinigung der Amplifikate und Sequenzierung.....	41
2.16	Chromatogramm-Analyse.....	41
2.17	Datenverfügbarkeit	43
2.18	Phylogenetische Analyse	43
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Allel-basierte MLST-Analyse	44
3.2	Sequenz-basierte MLST-Analyse.....	50
3.3	<i>ankA</i> -basierte Typisierung.....	56
3.4	Amplifikation des <i>drhm</i> Gens und des APH_0919/APH_0922 Genlocus	63
4	Diskussion	70
5	Zusammenfassung.....	75
6	Literaturverzeichnis	76
7	Anhang.....	90

Abkürzungsverzeichnis

<i>atpA</i>	ATP-Synthase F1, alpha Untereinheit
bp.....	Basenpaare
CDC.....	Centers for Disease Control and Prevention
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure/deoxyribonucleic acid
<i>dnaN</i>	DNA Polymerase III, beta Untereinheit
dNTP.....	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>drhm</i>	distantly related to human marker
<i>fumC</i>	Fumarat-Hydratase, Klasse II
<i>glyA</i>	Serin-Hydroxymethyltransferase
HGA.....	Humane granulozytäre Anaplasiose
kb.....	Kilo-Basenpaare
<i>mdh</i>	Malat-Dehydrogenase, NAD-abhängig
MLST.....	Multilocus-Sequenz-Typisierung/multilocus sequence typing
NJ.....	neighbor-joining
ORF.....	open reading frame
PBS.....	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung/phosphate buffered saline
PCR.....	Polymerase-Kettenreaktion/polymerase chain reaction
<i>pheS</i>	Phenylalanyl-tRNA-Synthetase, alpha Untereinheit
ST.....	Sequenztyp
<i>sucA</i>	2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, E1 Komponente
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomie der Anaplasmataceae	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von <i>I. scapularis</i>	4
Abbildung 3: Peripherer Blutausstrich mit <i>A. phagocytophilum</i> sichtbar als intrazytoplasmatischer Einschluss in einem neutrophilen Granulozyten	7
Abbildung 4: HGA-Falldefinition der CDC.....	8
Abbildung 5: Schematische Gegenüberstellung des APH_0919/APH_0922 Genlocus am Beispiel der Stämme <i>ApHz</i> und <i>ApNorV2</i> nach Al-Khedery et al.....	14
Abbildung 6: Position der vier Amplifikate, die zur Sequenzierung des <i>ankA</i> ORF des Clusters 6 generiert wurden	38
Abbildung 7: Position der sechs Amplifikate, die zur Sequenzierung des <i>ankA</i> ORF des Clusters 7 generiert wurden	40
Abbildung 8: Agarose-Gelelektrophorese für Amplifikate des <i>drhm</i> Gens (links) und des APH_0919/APH_0922 Genlocus (rechts).....	41
Abbildung 9: Ambiguität im Chromatogramm des <i>pheS</i> Allels der Probe red_deer_Ro1P in Vorwärts- (3f) und Rückwärtsstrang (4r) an Position 221 (Pfeile).....	42
Abbildung 10: NJ-Baum der konkatenierten Haushaltsgensequenzen der 114 <i>A. phagocytophilum</i> positiven Proben mit vollständigem Profil	53
Abbildung 11: NJ-Baum der konkatenierten Haushaltsgensequenzen der 114 <i>A. phagocytophilum</i> positiven Proben mit vollständigem Profil sowie von in PubMLST eingetragenen Sequenzen	55
Abbildung 12: NJ- Baum der 121 <i>ankA</i> Sequenzen der 115 <i>A. phagocytophilum</i> Stämme.....	60
Abbildung 13: NJ- Baum der 121 <i>ankA</i> Sequenzen der 115 <i>A. phagocytophilum</i> Stämme sowie von in der GenBank eingetragenen Sequenzen.....	62

Tabelle 1:	Wirt, Herkunft und <i>drhm</i> Status der verglichenen Gesamtgenom-Sequenzen	13
Tabelle 2:	Primer für die Amplifikation und Sequenzierung von Wirts-DNA, 16S rRNA Gen, Haushaltsgenen, <i>ankA</i> sowie von <i>drhm</i> und des APH_0919/APH_0922 Genlocus	15
Tabelle 3:	Gesamtanzahl und <i>A. phagocytophilum</i> positiv getestete Proben pro Wirtsspezies	21
Tabelle 4	Wirtsspezies, Herkunftsland, Klinik und Jahr der Probennahme der <i>A. phagocytophilum</i> positiven Proben	22
Tabelle 5:	Primer, Annealing- und Elongationsbedingungen sowie amplifizierte Fragmentlängen zum Nachweis wirtsspezifischer DNA	33
Tabelle 6:	Fragmentlängen der Haushaltsgene.....	36
Tabelle 7:	<i>ankA</i> Fragmentlängen abhängig vom <i>ankA</i> Cluster.....	37
Tabelle 8:	Primerkombinationen zur clusterspezifischen Amplifikation von <i>ankA</i>	37
Tabelle 9:	Primerkombinationen und Reaktionsbedingungen zur Amplifikation des <i>ankA</i> Clusters 6	38
Tabelle 10:	Primerkombinationen zur Amplifikation des <i>ankA</i> Clusters 7.....	39
Tabelle 11:	ST, Allelnummer, MLST und <i>ankA</i> Cluster der 114 <i>A. phagocytophilum</i> positiven Proben mit vollständigem Profil sowie der Probe bird_0176	44
Tabelle 12:	Proben mit Ambiguitäten in einem oder mehreren Haushaltsgenloci	49
Tabelle 13:	Im Rahmen dieser Arbeit neu detektierte Haushaltsgen-Allele.....	50
Tabelle 14:	<i>drhm</i> und APH_0919/APH_0922 Status der 114 <i>A. phagocytophilum</i> positiven Proben, 42 weiterer Stämme vom Menschen und von 11 Datensätzen aus der GenBank.....	64

1 Einleitung und Literaturdiskussion

1.1 Allgemeine Einführung und geschichtliche Einordnung

Anaplasma phagocytophilum ist ein obligat intrazelluläres Gram-negatives Bakterium aus der Gruppe der α -Proteobacteria, das hauptsächlich in neutrophilen Granulozyten seines Wirtes repliziert [1]. Die Übertragung der etwa 0,4 bis 1,5 μm großen Bakterien [2] erfolgt vektorabhängig durch Zecken der Gattung *Ixodes* [3]. In Europa ist *Ixodes ricinus* der Hauptvektor [3]. Das Krankheitsbild beim Menschen wird als humane granulozytäre Anaplasmosen (HGA) bezeichnet. Symptomatische Infektionen wurden neben dem Menschen auch bei verschiedenen Haus- und Nutztieren wie Hunden [4], Pferden [5], Katzen [6], Schafen und Rindern [7] beobachtet.

A. phagocytophilum wurde 1932 erstmals als Erreger des Weidediebers bei Schafen in Europa beschrieben [8]. Die ersten humanen Infektionen wurden 1994 als fieberhafte Erkrankungen nach Zeckenexposition bei einem kleinen Patientenkollektiv aus Minnesota und Wisconsin (USA) beobachtet [9]. Der erste Fall von HGA in Europa wurde 1997 aus Slowenien berichtet [10, 11].

1.2 Taxonomie

Aufgrund phylogenetischer Daten wurde 2001 eine Reklassifikation innerhalb der Familien der Rickettsiaceae und Anaplasmataceae vorgenommen [1] (Abbildung 1). Zur Familie der Anaplasmataceae zählen demnach die Genera *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Wolbachia*, *Neorickettsia* und *Neoehrlichia* [1, 12]. Zum Genus *Anaplasma* gehören als relevante Erreger *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. bovis* und *A. platys* [1, 13]. Unter dem Namen *A. phagocytophilum* werden seit der Reklassifikation die Spezies *Ehrlichia phagocytophila*, *E. equi* und das HGE-Agens zusammengefasst [1].

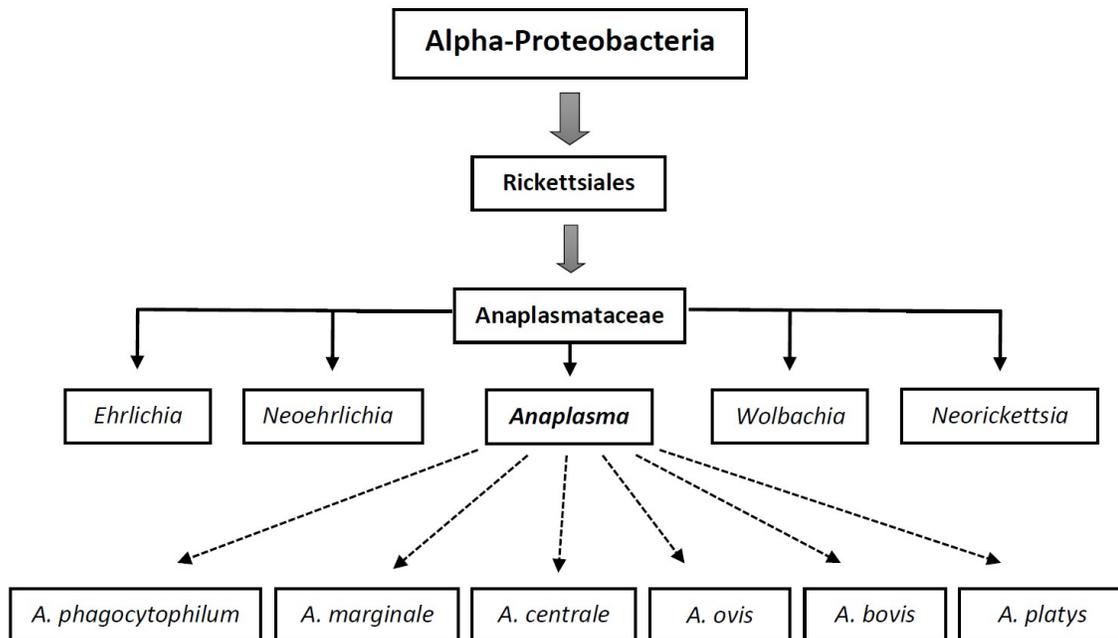


Abbildung 1: Taxonomie der Anaplasmataceae

1.3 Epidemiologie

Das Verbreitungsgebiet von *A. phagocytophilum* umfasst Nord- und Südamerika, Europa, Asien und Afrika [3]. Die Epidemiologie des humanen Krankheitsbildes ist jedoch in Nordamerika, Europa und Asien signifikant unterschiedlich. Die HGA ist in den Vereinigten Staaten seit 1999 eine meldepflichtige Erkrankung, deren Inzidenz seit dem Jahr 2000 stetig zunimmt (<https://www.cdc.gov/anaplasmosis/stats/index.html>). Im Jahr 2017 wurden den Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 5.762 Neuerkrankungen angezeigt. Im Jahr 2000 dagegen betrug die Zahl der gemeldeten Fälle lediglich 348. Im Vergleich zu Nordamerika tritt die HGA in Europa [14, 15] und Asien [16-20] selten auf.

Humane Infektionen in Europa sind unterschiedlich gut dokumentiert. Gesicherte Fälle wurden u.a. aus Belgien [21-23], Frankreich [24-27], den Niederlanden [14, 28], Österreich [29, 30], Polen [31, 32], Schweden [33, 34], Slowenien [10, 11, 14, 35-39] und Spanien [40] berichtet.

Hierzu in Diskrepanz stehen allerdings die Verbreitung des Vektors und die Seroprävalenz in Europa. Molekulargenetischen Untersuchungen zufolge ist es wahrscheinlich, dass mit *A. phagocytophilum* infizierte Zecken in allen Ländern Europas vorkommen dürften [3]. Die Angaben zur Infektionsrate von *I. ricinus*

schwanken jedoch stark und reichen von 0,8% in der Schweiz [41], 3,2% in Slowenien [42], 9,2% in Schweden [43] bis hin zu 24,4% in Italien [44]. Der Median der Infektionsprävalenz wurde in Europa für *I. ricinus* mit 3% und in Nordamerika mit 4,7% für *I. scapularis* und *I. pacificus* angegeben [45]. Beide liegen in einem ähnlichen Bereich, was im Widerspruch zu den in Europa beobachteten Erkrankungszahlen beim Menschen steht.

Eine Metaanalyse 28.927 humaner Datensätze aus 56 Studien schätzte, dass beim Menschen die gepoolte Seroprävalenz für *A. phagocytophilum* global 8,4% beträgt [46]. Die Seroprävalenz war in der gesunden Bevölkerung mit 5,0% am niedrigsten und in Hochrisikokollektiven mit 13,8% am höchsten [46]. Die mediane Seroprävalenz in Europa wird mit 6,2% angegeben [45]. In Deutschland wurden bei 1,6% bis 2,6% der Normalbevölkerung Antikörper gegen *A. phagocytophilum* gefunden [47-50], was den Kontakt mit dem Erreger wahrscheinlich macht.

Symptomatische *A. phagocytophilum* Infektionen traten in Deutschland bei Pferden [51, 52], Hunden [53-56], Rindern [57-60] und Ziegen [61] auf. Die in Deutschland bei Hunden und Pferden nachgewiesenen Stämme waren zu denen des Menschen homolog [62], daher ist anzunehmen, dass die HGA auch hierzulande auftreten dürfte.

1.4 Transmission und Infektionszyklus

A. phagocytophilum wird durch Zecken der Gattung *Ixodes* übertragen [3]. Diese durchlaufen im Rahmen ihrer Entwicklung drei Stadien (Larve, Nymphe, adultes Tier) und zwei Häutungsprozesse [63] (Abbildung 2). In Europa ist *I. ricinus* der Hauptvektor [3]. Im östlichen Teil der USA erfolgt die Übertragung durch *I. scapularis*, im westlichen Teil der USA durch *I. pacificus* sowie in Nordost-Europa und in Asien durch *I. persulcatus* [3].

Die Wirtsspezies werden im Rahmen einer Blutmahlzeit durch Nymphen oder adulte Zecken mit *A. phagocytophilum* infiziert, da *A. phagocytophilum* zumindest in *Ixodes* Zecken nicht transovariell übertragen wird [64]. Basierend auf Untersuchungen am Mausmodell muss zur Erregertransmission eine Saugdauer der Zecke von mindestens 24 h gegeben sein [65].

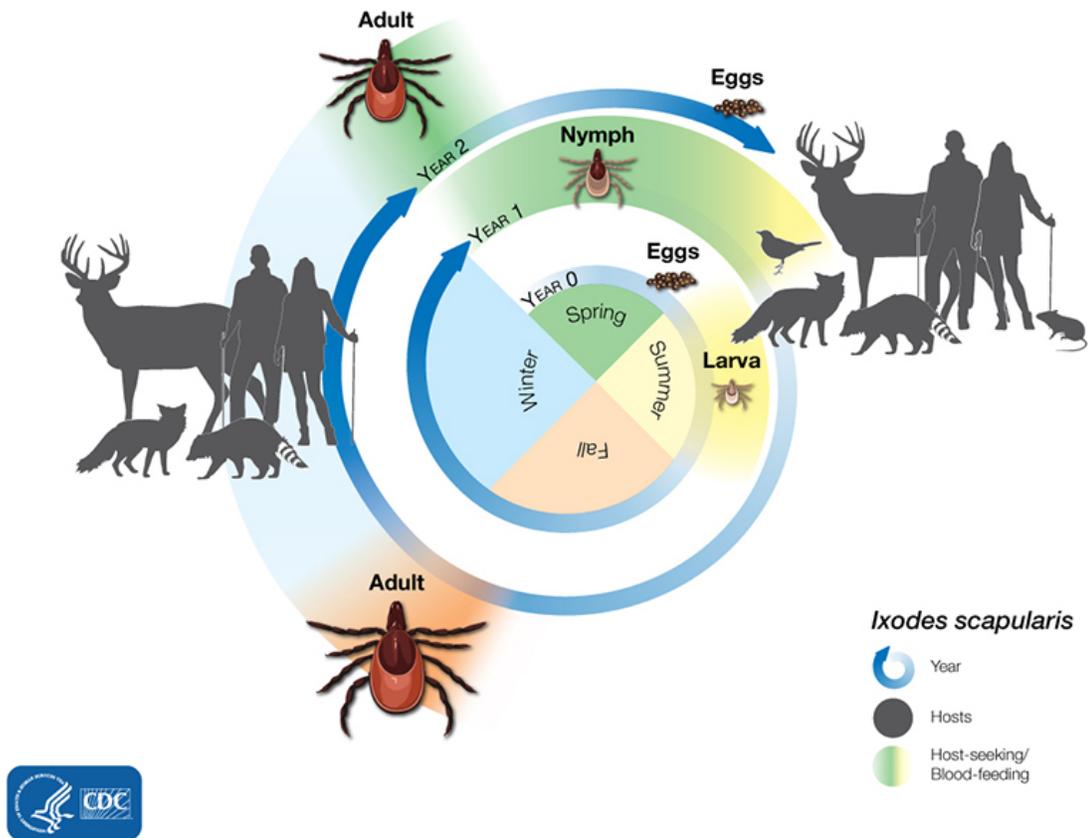


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *I. scapularis* (mit freundlicher Genehmigung der CDC, Atlanta, USA)

Im Gegensatz zu *Dermacentor albipictus* [3, 64, 66, 67] wird *A. phagocytophilum* in Zecken der Gattung *Ixodes* nur transstadiell übertragen [64]. Es ist daher anzunehmen, dass *A. phagocytophilum* zur Aufrechterhaltung seines Infektionszyklus auf Reservoirwirte angewiesen ist, wobei der Mensch als Fehlwirt gilt [3].

Neben der klassischen Übertragung durch Zecken besteht in seltenen Fällen die Möglichkeit einer Ansteckung durch Blutprodukte [68-73]. Weiterhin wurde vereinzelt das Auftreten einer humanen perinatalen Infektion beschrieben [74, 75].

1.5 Reservoirwirte

Die Identifizierung möglicher Reservoirwirte ist komplex, da *A. phagocytophilum* eine hohe genetische Variabilität aufweist [76]. Auf Subspezies-Ebene existiert eine Vielzahl an Stammvarianten, die sich offenbar hinsichtlich Virulenz und Reservoirwirt

unterscheiden [76, 77]. Basierend auf Analysen des 16S rRNA Gens wurden für die USA zwei *A. phagocytophilum* Varianten mit möglicherweise unterschiedlichem Wirtstropismus identifiziert. Im östlichen Teil der USA gilt die Weißfußmaus (*Peromyscus leucopus*) als Hauptreservoir der humanpathogenen Stammvariante Ap-ha, welche ebenso zur Infektion von Hunden und Pferden befähigt ist [76]. Als weitere Reservoirwirte der Ap-ha Variante wurden im westlichen Teil der USA das Gelbwangen-Streifenhörnchen (*Tamias ochrogenys*) sowie die Dunkelfuß-Buschratte (*Neotoma fuscipes*) diskutiert [76]. Für die als nicht-humanpathogen beschriebene Variante Ap-V1 ist für den Osten der USA bisher nur der Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus*) als möglicher Reservoirwirt identifiziert worden [76, 78].

Im Vergleich zu Nord-Amerika ist die Lage in Eurasien weniger klar. So wurden europäische 16S rRNA Genvarianten identifiziert, die sowohl Ähnlichkeit zur Variante Ap-ha als auch zu Ap-V1 zeigten [76]. Weiterhin konnte für Europa bisher keine Spezies sicher als Reservoirwirt benannt werden, obgleich eine Vielzahl von Säuge- und Nagetieren mit hoher Prävalenz infiziert ist [3]. Diskutiert wurden Rehe (*Capreolus capreolus*), Rothirsche (*Cervus elaphus*), Wildschweine (*Sus scrofa*), Igel (*Erinaceus europaeus*) und verschiedene Nagetiere [62, 76, 79]. Sowohl Rehe als auch Rothirsche kommen nach aktueller Datenlage jedoch wahrscheinlich nicht als Reservoir für Stammvarianten mit humanem, caninem und equinem Tropismus infrage [62]. Dennoch gelten Rothirsche, anders als Rehe, als mögliches Reservoir für Varianten mit Tropismus für Nutztiere wie Schafe und Rinder [62, 76].

1.6 Pathophysiologie

A. phagocytophilum wird über rezeptorvermittelte Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen [80]. Der Erreger repliziert innerhalb einer membranumschlossenen Vakuole im Zytoplasma der Wirtszelle [81]. Diese intrazytoplasmatischen Einschlüsse werden als Morulae (von lateinisch morum = Maulbeere) bezeichnet und können lichtmikroskopisch in Giemsa-gefärbten Blutausstrichen nachgewiesen werden [82]. Durch Induktion der Expression antiapoptotischer Proteine verzögert der Erreger den programmierten Zelltod in neutrophilen Granulozyten soweit, dass ihm eine ausreichende Zeitspanne zur Replikation zur Verfügung steht [83]. Die Mechanismen, die *A. phagocytophilum* ein Überleben innerhalb des stark antimikrobiellen Milieus neutrophiler Granulozyten ermöglichen, sind zum aktuellen Zeitpunkt nicht endgültig verstanden. Eine wichtige Rolle spielen hierbei jedoch die Hemmung der Phagosom-Lysosom-Verschmelzung sowie die Beeinflussung der

NADPH-Oxidase zur Vermeidung des respiratorischen Bursts [84]. Ein weiterer wesentlicher durch das AnxA Protein vermittelter Faktor ist die Manipulation des Wirtszellmetabolismus durch Modulation der Genexpression auf Transkriptionsebene [83].

1.7 Humane Granulozytäre Anaplasiose (HGA)

Fälle von HGA werden das ganze Jahr über beobachtet. Es besteht jedoch in Übereinstimmung mit der Hauptaktivitätszeit von Zecken eine jahreszeitliche Häufung von Erkrankungen in den Sommermonaten Mai bis August für die USA [85] und Juni bis August für Europa [14]. Frauen sind hierbei deutlich seltener (RR = 0,7) betroffen [85].

Bisherige Erkenntnisse stützen sich aufgrund der höheren Inzidenz weitestgehend auf Beobachtungen aus den USA. Erkrankte Personen berichten über eine stattgehabte Zeckenexpositionen ein bis zwei Wochen vor Einsetzen klinischer Beschwerden und beklagen häufig erhöhte Temperatur, Schwitzen, Rigor, Kopf- und Gliederschmerzen sowie Arthralgien [86]. Laborchemisch finden sich regelmäßig eine Thrombo- und Leukopenie sowie erhöhte Serumtransaminasenspiegel [2, 86]. Obwohl die überwiegende Mehrheit der Infektionen selbstlimitierend und milde bis subklinisch verläuft [87], kommt es selten zu potenziell lebensbedrohliche Komplikationen wie septischem Schock, Atemnotsyndrom, Nierenversagen, Meningitis und Enzephalitis [86]. In 36% der symptomatisch verlaufenden Fälle besteht die Notwendigkeit einer stationären Behandlung [85]. Die allgemeine Letalität wird mit 0,6% angegeben [85]. Insgesamt ist die Prognose erkrankter Personen als günstig zu bewerten.

1.8 Diagnostik

Der direkte Erregernachweis ist durch Mikroskopie (Abbildung 3), Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Anzucht in der Zellkultur erreichbar [82]. Der indirekte Nachweis mittels Immunfluoreszenztest aus Patientenserum ist nur retrospektiv durch Vergleichsuntersuchungen zwischen einem Akut- und einem Rekonvaleszenzserum möglich. Die Seren sollten im Abstand von 2 – 4 Wochen entnommen werden. Hierbei gilt ein IgG-Titeranstieg um mindestens den Faktor 4 als beweisend für eine stattgehabte Infektion (<https://wwwn.cdc.gov/nndss/conditions/ehrlichiosis-and-anaplasmosis/case-definition/2008/>) [88, 89]. Anhand der in Abbildung 4 aufgeführten Kriterien, kann bei Vorliegen klinischer Symptome die Diagnose HGA gestellt werden.

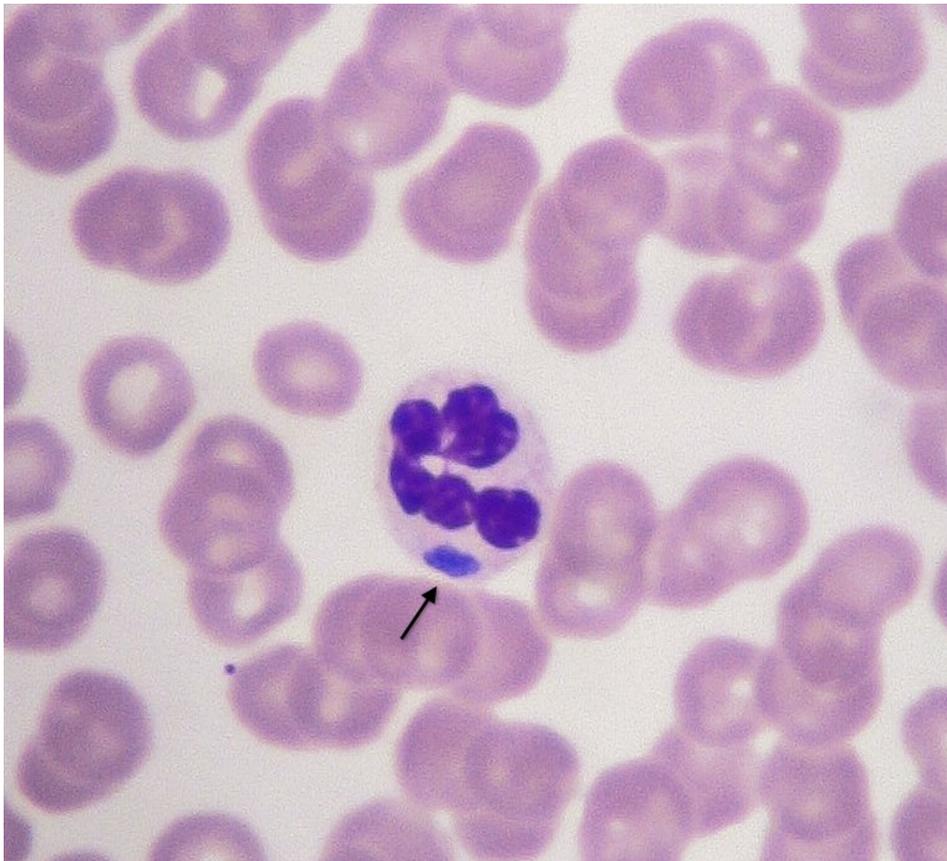


Abbildung 3: Peripherer Blutausstrich mit *A. phagocytophilum* sichtbar als intrazytoplasmatischer Einschluss in einem neutrophilen Granulozyten, Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:1000 (mit freundlicher Genehmigung von Friederike v. Loewenich, Mainz)

Wahrscheinliche HGA:

entsprechende klinische Symptomatik sowie eines der folgenden Kriterien:

- erhöhter IgG oder IgM Antikörpertiter
- mikroskopischer Nachweis von Morulae

Bestätigte HGA:

entsprechende klinische Symptomatik sowie eines der folgenden Kriterien:

- vierfacher IgG-Titeranstieg im Immunfluoreszenztest zwischen einem Serum aus der ersten Krankheitswoche und einem 2 – 4 Wochen später entnommenen Serum
- positiver Erregernachweis von Erreger-DNA in der PCR
- Erregeranzucht in der Zellkultur

Abbildung 4: HGA-Falldefinition der CDC (<https://wwwn.cdc.gov/nndss/conditions/ehrlichiosis-and-anaplasmosis/case-definition/2008/>)

1.9 Präventionsmaßnahmen

Persönliche Schutzkleidung und expositionsminimierende Verhaltensmaßnahmen nehmen einen hohen Stellenwert bei der Primärprävention ein. Personen in Endemiegebieten sollten zur Vermeidung von Zeckenbefall möglichst langarmige Kleidung, langbeinige Hosen sowie festes geschlossenes Schuhwerk tragen [86]. Nach jedem Aufenthalt in Risikogebieten empfiehlt sich eine sorgsame Selbstuntersuchung auf Zecken und deren sofortige Entfernung [86]. Studien am Mausmodell legen nahe, dass zur Erregerübertragung eine mindestens 24-stündige Saugdauer gegeben sein muss [65]. Die Nutzung von Repellents zur Anwendung auf der Haut oder auf Kleidungsstücken ist bei hohem individuellem Expositionsrisiko sinnvoll [86]. Impfstoffe zur Primärprävention existieren derzeit weder für Mensch noch Tier. Zum aktuellen Zeitpunkt ist unklar, ob und wenn ja über welchen Zeitraum eine durchgemachte Infektion mit *A. phagocytophilum* vor einer Reinfektion schützt [2].

1.10 Therapie

Die Therapie der Wahl für Erwachsene besteht in 100 mg Doxycyclin p.o. alle 12 h für die Dauer von 7 - 10 Tagen [86]. Kinder im Alter über acht Jahre sollten eine körperrgewichtsadaptierte Therapie mit Doxycyclin von 4,4 mg/kg/24 h erhalten [86]. Bei schwerem klinischen Verlauf soll Doxycyclin auch bei Kindern unabhängig von deren Alter zur Anwendung kommen. Nach Therapiebeginn kommt es innerhalb von 24 bis 48 h zu einer Besserung des klinischen Befundes. Bei Unverträglichkeit oder Kontraindikationen gegenüber Doxycyclin kann auf Rifampicin ausgewichen werden [86].

1.11 Molekulargenetische Charakterisierung als Einzelgenanalyse

Obwohl durch die 2001 vorgenommene Reklassifikation *E. phagocytophila*, *E. equi* und das HGE-Agens zur Spezies *A. phagocytophilum* zusammengefasst wurden [1], wurden genotypische Unterschiede auf Subspeziesebene beobachtet [76]. Diese korrelieren zumindest zum Teil mit der aus Kreuzinfektionsversuchen stammenden Beobachtung, dass nicht alle Wirte gleichermaßen für Stämme unterschiedlicher Herkunft empfänglich sind. Isolate vom Menschen erzeugten in Pferden [90-92] und zum Teil auch in Hunden [93] das klinische Bild einer granulozytären Anaplasrose. Schafe [94, 95] und Rinder [96, 97] machten nach einer Infektion mit einem humanen Stamm dagegen nur eine subklinische Infektion durch. Ähnliches wurde beobachtet, wenn Schafe [95, 98] und Rinder [96] mit einem Pferde-Isolat infiziert wurden. Pferde wiederum zeigen bei Inokulation mit einem bovinen Isolat keine Krankheitssymptome [97, 99].

Um den beschriebenen Wirtstropismus mit molekularen Markern zu korrelieren und potentielle Reservoirwirte zu identifizieren, wurden verschiedene Genloci verwendet [12, 76]. Besonders häufig wurden das 16S rRNA Gen sowie die *groEL*, *msp2*, *msp4* und *ankA* Gene betrachtet [76].

Das 16S rRNA Gen hat sich jedoch als evolutionär zu konserviert erwiesen und ist daher zur Charakterisierung verschiedener Stämme auf Subspeziesebene ungeeignet [62, 100-104].

Verglichen mit dem 16S rRNA Gen weist das *groEL* Gen eine höhere Variabilität auf [105]. Mittels *groEL*-basierter Typisierung konnten in Europa vier Ökotypen unterschieden werden [106]. Stämme von Menschen, Hunden, Pferden, Schafen, Ziegen und Rindern sowie von Rothirschen, Rehen, Mufflons, Igel, Wildschweinen und Rotfüchsen gehörten zum Ökotyp I. Sequenzen von Rehen wurden überwiegend

dem Ökotyp II zugeordnet, während solche von Nagern hauptsächlich dem Ökotyp III angehörten. Der Ökotyp IV wurden nur bei Stämmen von Vögeln gefunden [106]. Die Assoziation des Ökotyps IV mit Vögeln wurde in einer weiteren Studie bestätigt [107]. Die Analyse von *msp2* Sequenzen ergab eine Homologie von *A. phagocytophilum* Stämmen von Menschen, Hunden und Pferden [108]. Eine ähnliche Beobachtung wurde für das *msp4* Gen gemacht, da dieselbe Variante bei Menschen, Hunden und Wildschweinen gefunden wurde [109].

Auf das *ankA* Gen wird im Folgenden näher eingegangen, da eine *ankA*-basierte Typisierungsmethode in dieser Arbeit verwendet wurde. Das 1998 erstmals beschriebene und seit 2000 als *ankA* bezeichnete Gen kodiert für ein zytoplasmatisches Protein mit Ankyrin-ähnlichen Repeats im N-terminalem Bereich [12, 101, 110, 111]. Das von *ankA* kodierte Anka Protein gilt als wichtiger Pathogenitätsfaktor, dessen genaue Funktion jedoch nicht vollständig verstanden ist [83, 112]. Anka wird als Substrat über einen VirB/D4 abhängigen Typ IV-Sekretionsmechanismus in das Zytoplasma der Wirtszelle abgegeben und unterliegt im Anschluss einer Phosphorylierung durch ABI-1-abhängige Tyrosinkinase des Wirts [113]. Nach Translokation in den Zellkern bindet Anka sowohl an Proteine als auch an T-reiche DNA Sequenzen [114]. *A. phagocytophilum* nimmt so durch Beeinflussung der Genexpression sehr wahrscheinlich Einfluss auf den Wirtszellmetabolismus [115]. Da auch Gene betroffen sind, die für Proteine mit NADPH-Oxidasefunktion kodieren, dient dies wahrscheinlich auch der Immunevasion [114].

Das *ankA* Gen weist von allen genannten Genen die höchste Variabilität auf [62, 100, 101, 116]. Diese ist möglicherweise durch das Auftreten von Rekombinationsereignissen bedingt [117]. Daher besteht bei Verwendung dieses Locus die Möglichkeit, dass die phylogenetische Analyse gestört wird.

Es wurden fünf verschiedene *ankA* Cluster beschrieben und eine Korrelation zwischen Clusterzugehörigkeit und Wirtsspezies gezeigt [62, 100, 101, 117]. Zum Cluster 1 gehörten Stämme von Menschen, Hunden, Pferden, Katzen, Rindern und Schafen, aber auch von möglichen Reservoirwirten wie Rothirschen, Europäischen Bisons, Gämsen, Wildschweinen, Rotfüchsen und Igelrn [62, 100]. In Cluster 2 fanden sich ausschließlich Sequenzen von Rehen. Cluster 3 war auf Rehe und Rothirsche beschränkt. Zum Cluster 4 gehörten Stämme von Wiederkäuern wie Rindern,

Schafen, Ziegen, Rothirschen, Rehen, Europäischen Bisons und Gämsen. Cluster 5 enthielt ausschließlich Sequenzen von Wühl- und Spitzmäusen.

Auf Einzelgenanalysen basierende phylogenetische Ergebnisse besitzen generell nur eine beschränkte Aussagekraft [76]. Zwar können hierbei *A. phagocytophilum* Stämme hinsichtlich geographischer Herkunft und Wirtsursprung differenziert werden, jedoch ergeben sich in Abhängigkeit des betrachteten Locus teilweise widersprüchliche Ergebnisse [76]. Daher wurden Verfahren entwickelt, die mehrere Loci einbeziehen.

1.12 Multilocus Sequence Typing (MLST)

Um ein Genotypisierungsverfahren zu etablieren, das eine einfache laborübergreifende Vergleichbarkeit der Daten gestattet, wurde 1998 das Multilocus Sequence Typing (MLST) vorgestellt [118]. Dieses ermöglicht eine standardisierte Unterscheidung verschiedener Isolate auf Subspeziesebene und löste die bis dahin übliche Multilocus Enzymelektrophorese ab [119]. Im Rahmen der Erstbeschreibung wurde für *Neisseria meningitidis* exemplarisch ein MLST-Schema entwickelt und validiert [118]. Zum heutigen Zeitpunkt existieren eine Vielzahl frei zugänglicher MLST-Datenbanken im Internet, z.B. die PubMLST-Homepage (<https://pubmlst.org/>), die eine globale Vergleichbarkeit von Typisierungsschemata und Sequenzdaten gewährleisten [120].

Die verwendeten Genloci kodieren in der Regel für Proteine, die zur Aufrechterhaltung essentieller metabolischer Funktionen einer stabilisierenden Selektion unterliegen und aufgrund dessen auch als Haushaltsgene bezeichnet werden [121]. Der Vorteil bei Betrachtung dieser Gene besteht darin, dass sie sich als Teil des Kerngenoms mit moderater Geschwindigkeit verändern, woraus ein stabiles phylogenetisches Signal resultiert [122]. MLST-Schemata werden so konzipiert, dass die verwendeten Loci ein möglichst ähnliches Maß an Nukleotidsubstitutionen aufweisen [121]. Ein ausreichend hoher physischer chromosomaler Abstand der Loci zueinander als auch zu Genen, die einer diversifizierenden Selektion unterliegen, ist ebenfalls anzustreben, um eine atypisch hohe Diversität aufgrund von Rekombinationsereignissen zu vermeiden [119]. In Abhängigkeit des gewünschten phylogenetischen Auflösungsvermögens wird eine unterschiedliche Anzahl an Genloci betrachtet [120]. Das zu erzielende Auflösungsvermögen wird durch die Länge der Genfragmente und die Diversität innerhalb des zu untersuchenden Kollektivs beeinflusst [122]. Obwohl die Ergebnisse

MLST-basierter Verfahren nur auf einem kleinen Teil des Kerngenoms beruhen, zeigen diese dennoch eine hohe Übereinstimmung mit Gesamtgenomdaten [119].

Für gängige Typisierungsschemata werden Genfragmente einer Länge zwischen 400 und 600 Basenpaaren (bp) von 6 bis 10 Genen ausgewertet [62, 116, 121, 123]. Hierbei war die Wahl der Fragmentlängen initial durch technische Restriktionen zum Zeitpunkt der Entwicklung begründet. Diese wurden jedoch bis heute aus Gründen der Praktikabilität weitestgehend beibehalten [121].

Im Rahmen der Erstbeschreibung des MLST-Verfahrens waren 7 Gene ausreichend, um invasive *N. meningitidis* Stämme sicher differenzieren zu können [121]. Auch heute kann für die meisten Fragestellungen durch 7 Gene eine ausreichend hohe Diskrimination erreicht werden [118, 119, 122]. Im Abgleich mit einer Alleldatenbank wird identischen Haushaltsgensequenzen dieselbe und bisher unbekanntene eine neue Allelnummer in aufsteigender Reihenfolge zugewiesen [118]. Für jedes Isolat ergibt sich aus der Kombination aller Allelnummern der Sequenztyp (ST) [118]. Die Vergabe der Nummer des ST erfolgt analog zur Vergabe der Allelnummern. Die Auswertung der MLST-Daten beruht je nach Fragestellung auf der Analyse der Allelnummern (Allel-basierte Auswertung) oder der Betrachtung der Sequenzdaten (Sequenz-basierte Auswertung) [121].

2006 wurde die erste Gesamtgenom-Sequenz von *A. phagocytophilum* veröffentlicht [124]. Dies erlaubte, Genloci auszuwählen, die durch einen Abstand von mindestens 10 Kilobasen (kb) voneinander getrennt auf dem Chromosom lagen [62]. Außerdem konnten Primer entwickelt werden, die zur Amplifikation der ausgewählten Fragmente geeignet waren.

Im Rahmen dieser Arbeit fand das 2014 von Huhn et al. [62] vorgestellte MLST-Schema Anwendung, das die sieben Gene *pheS* (Phenylalanyl-tRNA-Synthetase, alpha Untereinheit), *glyA* (Serin-Hydroxymethyltransferase), *fumC* (Fumarat-Hydratase, Klasse II), *mdh* (Malat-Dehydrogenase, NAD-abhängig), *sucA* (2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, E1 Komponente), *dnaN* (DNA Polymerase III, beta Untereinheit) und *atpA* (ATP-Synthase F1, alpha Untereinheit) verwendet. Mittels dieses MLST-Schemas konnten bislang 3 Cluster unterschieden werden [62]. Zum Cluster 1 gehörten Stämme von Menschen, Hunden, Pferden, Katzen, Rindern, Schafen und Ziegen, aber auch von möglichen Reservoirwirten wie Rothirschen, Europäischen Bisons, Gämsen, Wildschweinen, Rotfüchsen und Igeln. In Cluster 2

finden sich fast ausschließlich Sequenzen von Rehen. Cluster 3 war auf Sequenzen von Wühl- und Spitzmäusen beschränkt.

Es wurde ein weiteres Multilocus Sequence Verfahren vorgeschlagen [116], dass 9 verschiedene Genloci verwendet (*groESL*, *msp4*, *ankA*, *gyrA*, *recG*, *polA*, *typA*, *pleD* sowie die Region zwischen den beiden Genen APH_1099 und APH_1100). Auch hier wurden drei verschiedene Cluster beschrieben. Ein Cluster enthielt nur Genotypen vom Rind, während ein anderer solche von Rindern, Pferden und Hunden aufwies. Dem dritten Cluster wurden die Sequenzen aller Rehe und vereinzelt solche von Rindern zugewiesen.

1.13 *drhm* Gen und APH_0919/APH_0922 Genlocus

2014 wurde ein Vergleich von 7 Gesamtgenom-Sequenzen von *A. phagocytophilum* publiziert [125] (Tabelle 1)

Tabelle 1: Wirt, Herkunft und *drhm* Status der verglichenen Gesamtgenom-Sequenzen [125]

Stamm	Wirt	Herkunft	<i>drhm</i> Status
<i>ApHz</i>	Mensch	Nord-Amerika	negativ
<i>ApDog</i>	Hund	Nord-Amerika	negativ
<i>ApJM</i>	Nager	Nord-Amerika	negativ
<i>ApMRK</i>	Pferd	Nord-Amerika	positiv
<i>ApCRT35</i>	Zecke	Nord-Amerika	positiv
<i>ApNorV1</i>	Schaf	Europa	positiv
<i>ApNorV2</i>	Schaf	Europa	positiv

Hierbei zeigte sich, dass *ApHz*, *ApDog* und *ApJM* im Vergleich zu den anderen Stämmen an nahezu identischer Stelle eine Deletion des Genoms von bis zu 4,5 kb aufwiesen. Die Autoren vermuteten, dass diese nur bei Stämmen auftritt, die zur humanpathogenen Stammvariante *ApHz* homolog sind.

Im entsprechenden Abschnitt des Genoms liegen stammabhängig zwei verschiedene Open Reading Frames (ORF), die eine degenerierte Kopie eines ABC-Transportergens sowie ein bis zwei Kopien des distantly related to human marker (*drhm*) Gens darstellen (Abbildung 5). Die Anzahl der vorhandenen Kopien und deren Leserichtung unterscheiden sich in Abhängigkeit vom jeweiligen Stamm [125].

Der bei einigen Stämmen deletierte Bereich wird von zwei Paaren invers duplizierter ORF (APH_0919/APH_0920 und APH_0921/APH_0922) flankiert.

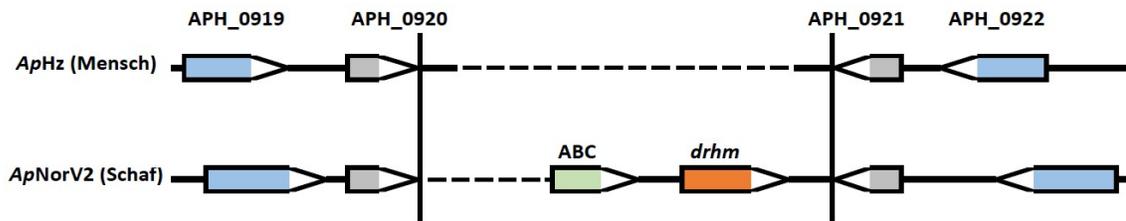


Abbildung 5: Schematische Gegenüberstellung des APH_0919/APH_0922 Genlocus am Beispiel der Stämme *ApHz* und *ApNorV2* nach Al-Khedery et al. [125]

Mittels PCR wurden weitere Stämme auf das Vorhandensein des *drhm* Gens untersucht. Nord-amerikanische Stämme vom Menschen und vom Hund waren *drhm* negativ [125]. Isolate, die aufgrund ihrer 16S rRNA Gensequenz der als nicht-humanpathogenen beschriebenen Variante Ap-V1 zugeordnet wurden, waren *drhm* positiv. Es wurde daher postuliert, dass die Deletion des *drhm* Gens als Marker zur Identifikation humanpathogener *A. phagocytophilum* Stämme dienen könnte [125].

Eine Untersuchung unter Einbeziehung weiterer Wirtsspezies kam allerdings zu dem Schluss, dass vielmehr für Nord-Amerika ein Zusammenhang zwischen *drhm* Status und der geographischen Herkunft des Stammes besteht. [126]. Eine Korrelation mit der Wirtsspezies wurde nicht gefunden.

Mit Ausnahme zweier Stämme vom Schaf, die *drhm* positiv waren [125], existieren bislang keine Daten zur Situation in Europa und Asien.

1.14 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Inzidenz der HGA in Nordamerika und Europa ist nach wie vor unterschiedlich [127]. Bislang hat die vergleichende molekulargenetische Charakterisierung von humanen *A. phagocytophilum* Stämmen keine hinreichende Erklärung für die differierende Epidemiologie ergeben. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit Stämme von Menschen und weiteren Wirten aus Europa und den USA mittels dreier verschiedener Typisierungsverfahren (MLST, *ankA*-basierte Typisierung, *drhm* Genpositivität) analysiert werden. Dies sollte zeigen, ob (1) genetische Merkmale die unterschiedliche Epidemiologie erklären können und (2) ob molekulare Marker der Humanpathogenität definiert werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Deoxynucleoside Triphosphate Set	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethanol 99,8%	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
ExoSAP-IT	USB, Staufen
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	ThermoFisher Scientific, Schwerte
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Isopropanol 99,8%	Sigma Aldrich, Taufkirchen
peqGold Universal Agarose	VWR, Darmstadt
Phosphate Buffered Saline (PBS)	ThermoFisher Scientific, Schwerte
pUC Mix Marker 8	ThermoFisher Scientific, Schwerte
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNase A	ThermoFisher Scientific, Schwerte
<i>Taq</i> DNA Polymerase, rekombinant	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Ultra Pure Water	Biochrom, Berlin

2.2 Primer

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion in Martinsried synthetisiert und sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Primer für die Amplifikation und Sequenzierung von Wirts-DNA, 16S rRNA Gen, Haushaltsgenen, *ankA* sowie von *drhm* und des APH_0919/APH_0922 Genlocus

Primer-Name	Nukleotidsequenz (5' - 3')
Wirts-DNA	
16S+1	CTG CTC AAT GAT TTT TTA AAT TGC TGT GG
16S-2	TTA CGC TGT TAT CCC TAG AG
Fuchs f	TGC TGG TGC CAG AAG TCA AT
Fuchs r	CTG CTG ATA GTA TGC TCC AG
G6PDH 1f	ACA GGG ACA GAG GGA GAA
G6PDH 1r	AAC GCA AAG CTG AAG TGA

Primer-Name	Nukleotidsequenz (5' - 3')
HBG 1	GAA GAG CAA AGG ACA GGT AC
HBG 2	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC
Hirsch cyb b f	CCT GAT GAA ATT TCG GCT CAT
Hirsch cyb b r	GAA GAA GAG GCA TGA GAA TT
Hund f	AGA CGG AGA TAC AAT TTC ATG C
Hund r	CCT GAA GAC GAT TCC TGG AC
Kuh f	CTG GGT GGC AAC TAT TGT G
Kuh r	GAG GGG GAA GAG AAG AGA AAG
Nager G6PDH f	AGA GGC TGG AAC CGC ATC AT
Nager G6PDH r	AAT GTT GTC TCG ATT CCA GAT G
Sau 2f	AGG GGG AGC AGA AGA AGA AC
Sau 2r	ATT GAC CTG AGA TTC GGC G
Pferd TNF antisense	GCT AAG CGG CTG ATG GTG TGG
Pferd TNF sense	AAG CAG ATG GGA TGT GGA GGA ATA
Vogel f	GTA ATC GCA GGC CTA ACA CT
Vogel r	CAA TCA TTC TAA TCC TAT TCC C
Ziege fo	TCC ACT CAA TAC ACC CCC TC
Ziege re	ACT GGC TGT CTT CCA ATT C
<i>A. phagocytophilum</i> 16S rRNA Gen	
GE 2	GGC AGT ATT AAA AGC AGC TCC AGG
GE 3a	CAC ATG CAA GTC GAA CGG ATT ATT C
GE 9f	AAC GGA TTA TTC TTT ATA GCT TGC T
GE 10r	TTC CGT TAA GAA GGA TCT AAT CTC C
Haushaltsgene	
<i>atpA</i>	
atpA 1f	CTC AAG ATT CTT AGA GAG AGA
atpA 1f a	ATA GAG AAC TTT GGT GGT CC
atpA 2r	ATA GCA CAA GCA GCA TAA GG
atpA 2r a	AGA AAG ATC ATC ATA TAC TAT CA
atpA 3f	ATG GAG CGG GAT TTG GAG AGA C
atpA 3f a	TAG GGG AGG TTC TTT CTG TA
atpA 4r	TTA TCC TTC TCA CTT GCC GCA C
atpA 4r a	AGT CTG ACG CAC CAG TAG C

Primer-Name	Nukleotidsequenz (5' - 3')
atpA 4r a deg	ART CYG ACG CAC CAG TAG C
<i>dnaN</i>	
dnaN 1f	AGA CAT ATC AAT AGA AGC GTG
dnaN 2r	CAA TTG ATA CAC TAT TAC CGC A
dnaN 2r a deg	AYG CTG AAC TYA ATA CCA ACT TA
dnaN 3f	TAG TGG CGT GTG GAA ATG CGA G
dnaN 3f a	TAG TGG CGT GTG GAA ATG CGC G
dnaN 4r	GTC TGG AAA CGT ACC GTC CAA C
dnaN 4r a	ACT ACT GAT ACA CGG TCT AC
<i>fumC</i>	
fumC 1f	CTT ACA AGA TGC TAC TCC GT
fumC 1f a	ACT GGC TCC GGA ACG CAG
fumC 1f deg	CTT ACA AGA TGC KAC TCC GT
fumC 2r	GAT TCA GCG CAG TCA CCA A
fumC 2r a	ACA ATT CTG TCG AAC TCT TCA G
fumC 3f	TGT CCG TTT GTG ACA GCA GAG
fumC 3f a	GTG GTG AGA TAG GAA GTA AGT
fumC 4r	TCA GCG ATG CAC CTA GCA AAG
fumC 4r a	GAC AAG CTT CAG GGT AAC TG
<i>glyA</i>	
glyA 1f	GTG ATA ATG ACA GAT GAT GAG
glyA 1f deg	GTG ATA ATG ACA GAT GAT GAR G
glyA 2r	AAG TAT CGT ACG GCA CTA CC
glyA 2r deg	AAG TAT CRT ACG GCA CYA CC
glyA 3f	TGT AAT AGC GGC GAA AGC GG
glyA 3f deg	TGT RAT AGC GGC GAA AGC RG
glyA 4r	AGC AAC CTC TTC TCT AAC CCC C
glyA 4r a deg	CRT ACG GCA CYA CCC TAA CA
<i>mdh</i>	
mdh 1f	GTA TTC GTA GAT GTG ATG GA
mdh 1f a	GTG TTG CGG GTA TCT GTC A
mdh 2r	CCA CAG CTT ATA AGG TCT GA
mdh 2r a	TCC TCC CTT GCG AGT CCT

Primer-Name	Nukleotidsequenz (5' - 3')
mdh 2r deg	CCA CAR CTT ATA AGG TCT GAA
mdh 3f	TGT GCC ACG GGG GAA GTT ATT G
mdh 3f deg	TGT GCC ACG RGG GAA GTT ATT G
mdh 4r	AGG CAA CAT AAG GTC ACC GTG C
mdh 4r a	CAC ATC CTC AGA ACT CAG AC
<i>pheS</i>	
pheS 1f	TCT AGG CCG CGT GTA TAT G
pheS 1f a	GCA TCA GAG AGA GGC AGA AT
pheS 1f deg	CGT CKA GGC YGC GTR TAT ATG
pheS 2r	TAA CCA GTC AAT GCG ACT AC
pheS 2r a	AAG CCG TAA TGC CCT AAC CA
pheS 2r b	GTA CTT AAG CAT TGC CAT TCT C
pheS 3f	CAC ACC TGT ACA TCA TCC AGC C
pheS 3f a	GTA ACA AAG GTA GTC AAG GAT
pheS 3f b	GGT TTG CTA CTG TTC GTG G
pheS 4r	CAC CCA TTC CGA AAG CAA AAC C
pheS 4r a	CTG AGG TCT CCA ATG TCG T
pheS 4r deg	CAC CCA TTC CGA AAG CAA ARC C
<i>sucA</i>	
sucA 1f	GCT TGC TAT GGA GTA TCG TG
sucA 1f a	GAA GCT GTG GTA GCA GTT AC
sucA 2r	CAA ATA TTC CGC ACC TGT AG
sucA 2r a	TTC CCA TAT CAC AAG AAC ATC
sucA 3f	ATG AGC CTA TGT TTA CGC AGC
sucA 3f a	AGA CGT TGT GAT AGA TGT GG
sucA 4r	TCT TCA CCA GAT AGA CGC ACC C
sucA 4r a	CAT GGC GGT GCG AGA AAG T
<i>ankA</i> Genfragment	
SLO fo1	GGG ATR AGT GCR GTG CAG YAT
SLO fo1 I	GGG ATG AGT GCA GTR CAK TAT
SLO fo1 II	GGG ATA AGT GCA GTG CAG TAT
SLO fo1 III	GGG ATR AGT GCA GTG CAG CAT
SLO fo1 IV	GGG ATA AGT GCG GTG CAG CAT

Primer-Name	Nukleotidsequenz (5' - 3')
SLO fo1 Nager	GTG TGC AGA CTC ACT ACT AC
SLO fo2	TTA CGC TGT RRT RGC ATR GAC
SLO fo2 I	TTA CGC TGT RRT AGC ATG RAC
SLO fo2 II+III	TTA CGC TGT AAT AGC ATA GAC
SLO fo2 IV	TTA CGC TGT ART RGC ATR GAC
SLO fo2 Nager	GAA GAA GTT GAG MGT ATG TTA C
SLO re1	ACT GCR GCM GCT ARA GGR CT
SLO re1 I	ACT GCA GCA GCT AAA GGG CT
SLO re1 II+III	ACT GCA GCT GCT AGA GGA CT
SLO re1 IV	ACT GCG GCC GCT AGA GGA CT
SLO re1 Nager	ACT CCC TTA TTT GCG GCT TG
SLO re2	AWR GWT CCS KYA GGA GYA TTT A
SLO re2 I	ATR GAT CCG GKA GGA GTA TTT A
SLO re2 II+III	TAA GTT CCT TCA GGA GTA TTT A
SLO re2 IV	AAA GTT CCC ATA GGA GCA TTT A
SLO re2 Nager	CTG CAG CCG TTA GAG GAC T
<i>ankA</i> ORF	
1F neu	ATG TTA AGA CTA TGT TAC GCT G
1R neu	GCC CTC TAC AGC AGC ACC A
1R1 neu	CAC CAT CCC TTA CAG GAA AC
1R2	AAT AAC TAC TCT TCC TTC C
1R4 neu	CAT ACT GCA CTG CAC TCA TCC
1R7	TGC ATC GTC ATT ACG CAC AAG GTC
2F1 neu	CAA GAG ACA ACT CTG GCT TTT
4F1 neu seq3	GCC TAT CTA CGA GGA CAT TA
4F2 neu	CAG AAG GAT TAC AGG GAG CA
4R1 mod	CTT TGA GGA GCT TCT GGT TG
Amsel beg fo1	AGG TAT ACA AGG AGG GTG CTT
Amsel beg re1	GAA GTT TCC ATC CTT TGC TGC
Amsel beg re2	AAT GTT CCT GCA TCT TGT GTA
Amsel end re1	AGG GCA GCT CCT GTC TGT G
Amsel end re2	GCA GCT CCT GTC TGT GGT G
Amsel end re3	KGG CCT TCA CTT TGA GRA GC

Primer-Name	Nukleotidsequenz (5' - 3')
Amsel mi fo1	CAA ATA CAA CTA TTA CCG CCG A
Amsel mi fo2	TGA AAG TGT TAA TTA AAG CAG GT
Amsel mi re1	GAA ATA GAT YYY MAA GWA GGA
Amsel mi seq fo1	ATA CGT CAT TGC ATA GTA GTC
Amsel mi seq fo2	ATA CAT GTG TAT TGG CTG ATG
Amsel mi seq re2	CTG TTT CTT CAG GTG GCA CA
D1	TAT TGA TCA AAG TAC CTC AGC G
D5	GTA YCT CAG CGA TTT TKC GGT AT
Deg 1 re	MTG CAC YGC ACT YAT CCC TT
Deg re2	YGG GAA YAT TAG YGC CTC TGC
Nager mi fo1	CTC CRT ATG TGC CAT CTG AAG
Nager mi fo2	TRA ATR TAG AGG GAA RAA CAC C
Nager U8	ATT GAA TAA AGG CCC CAA CA
U3	GAG GGC AAT CGC GAG TGT GCA G
U5 neu	GGA CAA GCA CGT GAG AAG GCA GGG
U7	GCG TCT GTA AGG CAG ATT GTG
U8	TAA GAT AGG TTT AGT AAG ACG
<i>drhm</i> und APH_0919/APH_0922 Genlocus	
APH_0919 1 f	ATA TCC CTG CCR TTT RTK CTG
APH_0919 2 r	GTG GTA YAT TAG ATG TAT CAA AA
APH_0919 3 f	CTG CTT CAY GCA ACS CTR TTA
APH_0919 4 r	TTA GAT GTA TCA AAA CAY ATT GC
drhm 1 f	CGT CAT GTG CAC TAA TAG CC
drhm 2 r	CTC TCA TGA AAA CTA GAC GAT
drhm 3 f	GCT ATT GCA ACA GTA ATG ACT
drhm 4 r	GGT ATG GTT CCA TTC TCC TG

2.3 Geräte

2720 Thermal Cycler

ThermoFisher Scientific, Schwerte

Centrifuge 5427 R

Eppendorf, Hamburg

ThermoMixer F1.5

Eppendorf, Hamburg

VWR Power Source 300 V

VWR, Darmstadt

2.4 Software

DNASar Lasergene 15

Lasergene, Madison, WI, USA

MEGA 10.0.5

[128]

TraceEditPro 1.2.1

Ridom GmbH, Würzburg

2.5 Proben

Es wurden insgesamt 527 Proben verschiedener Wirtsspezies untersucht (Tabelle 3). Davon wurden 33% (174/527) positiv auf *A. phagocytophilum* getestet. Im Ergebnisteil wird mit Ausnahme der Probe bird_0176 nur auf die positiven Proben Bezug genommen, für die vollständige Profile (MLST, *ankA*, *drhm*) bestimmt werden konnten (n = 114).

Tabelle 3: Gesamtanzahl und *A. phagocytophilum* positiv getestete Proben pro Wirtsspezies

Speziesname	Trivialname	Getestet (n)	Positiv (n)
<i>Bos taurus</i>	Rind	24	24
<i>Canis lupus familiaris</i>	Hund	20	14
<i>Capra aegagrus hircus</i>	Ziege	6	6
<i>Capra ibex</i>	Steinbock	2	2
<i>Capreolus capreolus</i>	Reh	13	13
<i>Cervus elaphus</i>	Rothirsch	31	19
<i>Cervus nippon</i>	Sikahirsch	19	9
<i>Corvus frugilegus</i>	Saatkrähe	8	0
<i>Corvus monedula</i>	Dohle	2	0
<i>Dama dama</i>	Damhirsch	5	4
<i>Equus caballus</i>	Pferd	18	18
<i>Felis catus</i>	Katze	2	2
<i>Garrulus glandarius</i>	Eichelhäher	1	0
<i>Haemaphysalis concinna</i>	-	1	0
<i>Homo sapiens</i>	Mensch	68	45 ¹
<i>I. arboricola</i>	-	5	0
<i>I. frontalis</i>	-	2	1
<i>I. ricinus</i>	Gemeiner Holzbock	20	2

Speziesname	Trivialname	Getestet (n)	Positiv (n)
<i>Mus musculus</i>	Hausmaus	187	0
<i>Ovis gmelini musimon</i>	Europäischer Mufflon	8	5
<i>Rattus spp.</i>	Ratte	72	0
<i>Sus scrofa</i>	Wildschwein	10	7
<i>Turdus merula</i>	Amsel	1	1
<i>Vulpes vulpes</i>	Rotfuchs	2	2

¹MLST und *ankA* Sequenzen in 42 Fällen durch Huhn et al. [62]

Die *A. phagocytophilum* positiven Proben sind in Tabelle 4 mit Angabe des Herkunftslandes, der Klinik und des Jahrs der Probennahme aufgeführt. Die 24 Proben vom Rind stammten von 16 verschiedenen Tieren, denen zu verschiedenen Zeitpunkten Blut abgenommen wurde [59].

Tabelle 4 Wirtsspezies, Herkunftsland, Klinik und Jahr der Probennahme der *A. phagocytophilum* positiven Proben

Probenname	Herkunftsland	Klinik	Jahr
1 Amsel			
bird_0176	Deutschland (1)	GT ¹	2014
2 Katzen			
cat_596400	Deutschland (2)	GA ²	2014
cat_971	Deutschland (3)	GT	2008
24 Rinder			
cow_14_0406	Deutschland (3)	GA	2011
cow_22_0907	Deutschland (3)	GT	2011
cow_22_1610	Deutschland (3)	GT	2011
cow_22_3005	Deutschland (3)	GA	2011
cow_28_0310	Deutschland (3)	GT	2011
cow_30_0406	Deutschland (3)	GT	2011
cow_30_1705	Deutschland (3)	GA	2011
cow_30_2506	Deutschland (3)	GT	2011
cow_35_1705	Deutschland (3)	GA	2011
cow_35_2506	Deutschland (3)	GT	2011

Probenname	Herkunftsland	Klinik	Jahr
cow_36_1905	Deutschland (3)	GA	2011
cow_361_1905	Deutschland (3)	GA	2011
cow_46_2205	Deutschland (3)	GA	2011
cow_46_2506	Deutschland (3)	GT	2011
cow_49_1905	Deutschland (3)	GA	2011
cow_52_1809	Deutschland (3)	GA	2011
cow_53_2506	Deutschland (3)	GA	2011
cow_57_0406	Deutschland (3)	GA	2011
cow_58_1705	Deutschland (3)	GA	2011
cow_59_0409	Deutschland (3)	GT	2011
cow_61_2206	Deutschland (3)	GA	2011
cow_7_1906	Deutschland (3)	GT	2011
cow_7_2506	Deutschland (3)	GT	2011
cow_A287	Deutschland (4)	GT	2012
14 Hunde			
dog_126418	Frankreich (2)	GA	2014
dog_555277	Deutschland (2)	GA	2014
dog_594819	Deutschland (2)	GA	2014
dog_597576	Österreich (2)	GA	2014
dog_601717	Deutschland (2)	GA	2014
dog_602430	Österreich (2)	GA	2014
dog_602741	Österreich (2)	GA	2014
dog_656166	Schweiz (2)	GA	2013
dog_660279	Schweden (2)	GA	2013
dog_723471	Schweden (2)	GA	2013
dog_747278	Dänemark (2)	GA	2013
dog_752482	Deutschland (2)	GA	2013
dog_Nico S36457_13	Deutschland (5)	GA	2013
dog_rosa isolate	Schweden (6)	GA	1995
4 Damhirsche			
fallow_deer_1	Deutschland (3)	GT	2013
fallow_deer_3	Deutschland (3)	GT	2013
fallow_deer_7	Deutschland (3)	GT	2013

Probenname	Herkunftsland	Klinik	Jahr
fallow_deer_8	Deutschland (3)	GT	2013
5 Ziegen			
goat_31298	Schweiz (7)	GA	2016
goat_A8July	Schweiz (3)	GT	2008
goat_B10June	Schweiz (3)	GT	2008
goat_B11June	Schweiz (3)	GT	2008
goat_M8October	Schweiz (3)	GT	2008
18 Pferde			
horse_11523712	Schweiz (7)	GA	2017
horse_11527691	Schweiz (7)	GA	2017
horse_1187640	Schweiz (7)	GA	2019
horse_689227	Deutschland (2)	GA	2013
horse_S1025_09	Deutschland (3)	GA	2009
horse_S1071_08	Deutschland (3)	GA	2008
horse_S1074_09	Deutschland (3)	GA	2009
horse_S1085_09	Deutschland (3)	GA	2009
horse_S1201_05	Deutschland (3)	GA	2005
horse_S1220_08	Deutschland (3)	GA	2008
horse_S1379_06	Deutschland (3)	GA	2006
horse_S1523_07	Deutschland (3)	GA	2007
horse_S1729_08	Deutschland (3)	GA	2008
horse_S1741_07	Deutschland (3)	GA	2007
horse_S1829_04	Deutschland (3)	GA	2004
horse_S2614_07	Deutschland (3)	GA	2007
horse_S2630_07	Deutschland (3)	GA	2007
horse_S654_04	Deutschland (3)	GA	2004
45 Menschen			
human_10015	Slowenien (8)	GA	2007
human_10377	Slowenien (8)	GA	2007
human_1148	Slowenien (8)	GA	2000
human_11946	Slowenien (8)	GA	2008
human_1566	Slowenien (8)	GA	200
human_1567	Slowenien (8)	GA	200

Probenname	Herkunftsland	Klinik	Jahr
human_1680	Slowenien (8)	GA	2001
human_2118	Slowenien (8)	GA	2001
human_3027	Slowenien (8)	GA	2002
human_3537	Slowenien (8)	GA	2002
human_451	Polen (9)	GA	2012
human_4598	Slowenien (8)	GA	2003
human_472	Polen (9)	GA	2012
human_4950	Slowenien (8)	GA	2003
human_6219	Slowenien (8)	GA	2004
human_6460	Slowenien (8)	GA	2004
human_6468	Slowenien (8)	GA	2004
human_6725	Slowenien (8)	GA	2004
human_7557	Slowenien (8)	GA	2005
human_8544	Slowenien (8)	GA	2006
human_8569	Slowenien (8)	GA	2006
human_9519	Slowenien (8)	GA	2007
human_96HE27	USA (10)	GA	1996
human_96HE54	USA (10)	GA	1996
human_96HE58	USA (10)	GA	1996
human_97HE97	USA (10)	GA	1997
human_9896	Slowenien (8)	GA	2007
human_98HE4	USA (10)	GA	1998
human_99HE4	USA (10)	GA	1999
human_D1153	Slowenien (8)	GA	2009
human_D1305	Slowenien (8)	GA	2009
human_D1552	Slowenien (8)	GA	2009
human_D2218	Slowenien (8)	GA	2010
human_D227	Slowenien (8)	GA	2008
human_D2384	Slowenien (8)	GA	2010
human_D2475	Slowenien (8)	GA	2010
human_D2482	Slowenien (8)	GA	2010
human_D2591	Slowenien (8)	GA	2010
human_D3259	Slowenien (8)	GA	2002

Probenname	Herkunftsland	Klinik	Jahr
human_D77	Slowenien (8)	GA	2008
human_HGE1	USA (11)	GA	1995
human_HZ	USA (11)	GA	1997
human_O3HE	USA (10)	GA	2003
human_Slovenia	Slowenien (12)	GA	2000
human_Webster	USA (10)	GA	1997
2 Steinböcke			
ibex_5	Österreich (3)	GT	2008
ibex_6	Österreich (3)	GT	2008
7 Mufflons			
mouflon_10	Österreich (3)	GT	2011
mouflon_12	Österreich (3)	GT	2012
mouflon_3	Österreich (3)	GT	2009
mouflon_4	Österreich (3)	GT	2009
mouflon_5	Österreich (3)	GT	2011
mouflon_7	Österreich (3)	GT	2012
mouflon_8	Österreich (3)	GT	2012
24 Rothirsche			
red_deer_M14	Österreich (3)	GT	2009
red_deer_M19	Österreich (3)	GT	2011
red_deer_M2	Österreich (3)	GT	2008
red_deer_M22	Österreich (3)	GT	2012
red_deer_M23	Österreich (3)	GT	2012
red_deer_M3	Österreich (3)	GT	2008
red_deer_M5	Österreich (3)	GT	2008
red_deer_M6	Österreich (3)	GT	2008
red_deer_M8	Österreich (3)	GT	2008
red_deer_M9	Österreich (3)	GT	2008
red_deer_Ro1	Deutschland (3)	GT	2012
red_deer_Ro11	Deutschland (3)	GT	2013
red_deer_Ro14	Deutschland (3)	GT	2013
red_deer_Ro15	Deutschland (3)	GT	2013
red_deer_Ro16	Deutschland (3)	GT	2013

Probenname	Herkunftsland	Klinik	Jahr
red_deer_Ro18	Deutschland (3)	GT	2013
red_deer_Ro1P	Deutschland (3)	GT	2013
red_deer_Ro2	Deutschland (3)	GT	2012
red_deer_Ro21P	Deutschland (3)	GT	2013
red_deer_Ro3	Deutschland (3)	GT	2012
red_deer_Ro4	Deutschland (3)	GT	2012
red_deer_Ro5	Deutschland (3)	GT	2012
red_deer_Ro6	Deutschland (3)	GT	2012
red_deer_Ro9	Deutschland (3)	GT	2013
2 Rotfüchse			
red_fox_0079	Deutschland (1)	GT	2014
red_fox_0115	Deutschland (1)	GT	2014
13 Rehe			
roe_deer_0185	Deutschland (1)	GT	2014
roe_deer_0278	Deutschland (1)	GT	2013
roe_deer_0279	Deutschland (1)	GT	2013
roe_deer_0342	Deutschland (1)	GT	2014
roe_deer_0359	Deutschland (1)	GT	2013
roe_deer_0568	Deutschland (1)	GT	2013
roe_deer_0570	Deutschland (1)	GT	2013
roe_deer_0571	Deutschland (1)	GT	2013
roe_deer_0573	Deutschland (1)	GT	2013
roe_deer_457	Deutschland (1)	GT	2014
roe_deer_510	Deutschland (1)	GT	2014
roe_deer_546	Deutschland (1)	GT	2014
roe_deer_555	Deutschland (1)	GT	2014
9 Sikahirsche			
sika_deer_11	Deutschland (3)	GT	2013
sika_deer_12	Deutschland (3)	GT	2013
sika_deer_13	Deutschland (3)	GT	2013
sika_deer_17	Deutschland (3)	GT	2013
sika_deer_23	Deutschland (3)	GT	2013
sika_deer_3	Deutschland (3)	GT	2011

Probenname	Herkunftsland	Klinik	Jahr
sika_deer_5	Deutschland (3)	GT	2011
sika_deer_7	Deutschland (3)	GT	2011
sika_deer_9	Deutschland (3)	GT	2013
2 I. ricinus von Amseln			
tick_CM20	Rumänien (13)	-	2011
tick_CS2	Rumänien (13)	-	2011
1 I. frontalis von der Amsel			
tick_CS3	Rumänien (13)	-	2016
7 Wildschweine			
wild_boar_0242	Deutschland (1)	GT	2013
wild_boar_0254	Deutschland (1)	GT	2013
wild_boar_0261	Deutschland (1)	GT	2013
wild_boar_0271	Deutschland (1)	GT	2013
wild_boar_0351	Deutschland (1)	GT	2013
wild_boar_0361	Deutschland (1)	GT	2013
wild_boar_441	Deutschland (1)	GT	2014

¹GT = Gesunder Träger, ²GA = granulozytäre Anaplasnose

(1)

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe
Karlsruhe, Deutschland

(2)

IDEXX Laboratories
Ludwigsburg, Deutschland

(3)

Institut für Infektionsmedizin
Friedrich-Loeffler-Institut
Greifswald, Deutschland

(4)

Klinik für kleine Klautiere

Tierärztliche Hochschule Hannover
Hannover, Deutschland

(5)
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Universitätsmedizin Mainz
Mainz, Deutschland

(6)
Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health
Swedish University of Agricultural Sciences
Uppsala, Schweden

(7)
IDEXX Diavet AG
Bäch, Schweiz

(8)
Institute of Microbiology and Immunology
University of Ljubljana
Ljubljana, Slowenien

(9)
Department of Infectious Diseases and Neuroinfections
Medical University Białystok
Białystok, Polen

(10)
Department of Pathology
Uniformed Services University of the Health Sciences
Bethesda, MD, USA

(11)
Department of Entomology

University of Minnesota
St. Paul, MN, USA

(12)

Institute of Microbiology and Immunology
University of Ljubljana
Ljubljana, Slowenien

(13)

Department of Parasitology and Parasitic Diseases
University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Cluj-Napoca
Cluj-Napoca, Rumänien

2.6 DNA-Präparation aus Blut

DNA aus Blutproben wurden mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit gemäß Herstelleranleitung aufgereinigt. Abweichend von der Herstellerempfehlung wurden 100 µl Blut anstatt 200 µl Blut eingesetzt und das fehlende Volumen mit 100 µl Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) ergänzt. Die Elution der Desoxyribonukleinsäure (DNA) erfolgte in 100 µl und damit in der Hälfte des vom Hersteller vorgesehenen Puffervolumens.

2.7 DNA-Präparation aus Milzgewebe

DNA aus Milzgewebe wurden mit dem QIAamp DNA Mini Kit gemäß Gebrauchsanweisung aufgereinigt. Abweichend von der Herstellerempfehlung wurde pro 10 mg Milzgewebe die doppelte Menge an ATL Puffer verwendet. Die Proben wurden über Nacht mit dem zweifachen Volumen an Proteinase K bei 56°C inkubiert. Es erfolgte eine Degradation der RNA durch Zugabe von 40 µl RNase A. In den nachfolgenden Schritten wurde die doppelte Menge an AL Puffer und Ethanol eingesetzt. Die DNA wurde in 100 µl AE-Puffer nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur eluiert.

2.8 Amplifikation wirtsspezifischer DNA

Die Amplifikation wirtsspezifischer DNA erfolgte indikationsabhängig zur Kontrolle des DNA-Extraktionsprozesses und um Inhibitionsergebnisse auszuschließen. Mit Ausnahme von Proben von Menschen und Zecken wurde der nachfolgend beschriebene Standardreaktionsansatz verwendet.

Standardreaktionsansatz:

Bestandteile	Volumen	Endkonzentration
Puffer 10 x	5,0 µl	1 x
dNTP 2 mM	5,0 µl	200 µM
MgCl ₂ 50 mM	2,0 µl	2 mM
Primer 1 20 µM	1,0 µl	400 nM
Primer 2 20 µM	1,0 µl	400 nM
<i>Taq</i> -Polymerase	0,2 µl	1 U
DNA	2 µl	
Ultra Pure Water	33,8 µl	
Gesamtvolumen	50 µl	

Ansatz zum Nachweis humaner DNA:

Bestandteile	Volumen	Endkonzentration
Puffer 10 x	5,0 µl	1 x
dNTP 2 mM	2,5 µl	100 µM
MgCl ₂ 50 mM	1,5 µl	1,5 mM
Primer HBG 1 20µM	1,0 µl	400 nM
Primer HBG 2 20µM	1,0 µl	400 nM
<i>Taq</i> -Polymerase	0,2 µl	1 U
DNA	2 µl	
Ultra Pure Water	36,8 µl	
Gesamtvolumen	50 µl	

Ansatz zum Nachweis zeckenspezifischer DNA:

Bestandteile	Volumen	Endkonzentration
Puffer 10 x	5,0 µl	1 x
dNTP 2 mM	5,0 µl	200 µM
MgCl ₂ 50 mM	1,5 µl	1,5 mM
Primer 16S+1 20 µM	2,5 µl	1000 nM
Primer 16S-2 20 µM	2,5 µl	1000 nM
<i>Taq</i> -Polymerase	0,2 µl	1 U
DNA	2 µl	
Ultra Pure Water	31,3 µl	
Gesamtvolumen	50 µl	

Die für die jeweilige Spezies verwendeten Primer, Annealing- und Extensionsbedingungen sowie die amplifizierten Fragmentlängen sind in Tabelle 5 dargestellt. Die Amplifikate wurden unter Mitführung eines Längenstandards (pUC Mix Marker 8 oder GeneRuler 100 bp DNA Ladder) in einem 2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert.

Reaktionsbedingungen für die Amplifikation wirtsspezifischer DNA:

Initiale Denaturierung	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	siehe Tabelle 5	
Extension	siehe Tabelle 5	
Finale Extension	72°C	10 min
Zyklen	40	

Tabelle 5: Primer, Annealing- und Elongationsbedingungen sowie amplifizierte Fragmentlängen zum Nachweis wirtsspezifischer DNA

Spezies	Primer	Annealing – Elongation	Fragment
Hund	Hund f + Hund r	56°C 30 s – 72°C 30 s	200 bp
Maus	G6PDH 1f + G6PDH 2r	55°C 30 s – 72°C 30 s	500 bp
Mensch	HBG 1 + HBG 2	57°C 30 s – 72°C 30 s	268 bp
Pferd	Pferd TNF sense + Pferd TNF antisense	64°C 30 s – 72°C 30 s	500 bp
Ratte	Nager G6PDH f + Nager G6PDH r	58°C 30 s – 72°C 30 s	200 bp
Rind	Kuh f + Kuh r	54°C 30 s – 72°C 30 s	200 bp
Rotfuchs	Fuchs f + Fuchs r	56°C 30 s – 72°C 30 s	380 bp
Rothirsch	Hirsch cyb b f + Hirsch cyb b r	52°C 30 s – 72°C 60 s	800 bp
Vogel	Vogel f + Vogel r	56°C 30 s – 72°C 30 s	539 bp
Wildschwein	Sau 2f + Sau 2r	54°C 30 s – 72°C 30 s	500 bp
Zecke	16S+1 + 16S-2	54°C 30 s – 72°C 30 s	300 bp
Ziege	Ziege fo + Ziege re	54°C 30 s – 72°C 30 s	260 bp

2.9 Amplifikation des 16S rRNA Gens

Die Amplifikation des 16S rRNA Gens diente zum Nachweis einer Infektion mit *A. phagocytophilum* und wurde als nested PCR durchgeführt. Hierbei fanden als äußere Primer GE 3a und GE 10r und sowie als innere Primer GE 9f und GE 2 Verwendung [129]. Die Amplifikate wurden unter Mitführung eines Längenstandards (pUC Mix Marker 8 oder GeneRuler 100 bp DNA Ladder) in einem 2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert.

Reaktionsansatz:

Bestandteile	Volumen	Endkonzentration
Puffer 10 x	5,0 µl	1 x
dNTP 2 mM	5,0 µl	200 µM
MgCl ₂ 50 mM	1,5 µl	1,5 mM
Vorwärtsprimer 20 µM	1,0 µl	400 nM
Rückwärtsprimer 20 µM	1,0 µl	400 nM
<i>Taq</i> -Polymerase	0,2 µl	1 U
DNA	2 µl	
Ultra Pure Water	34,3 µl	
Gesamtvolumen	50 µl	

Reaktionsbedingungen GE 3a + GE 10r:

Initiale Denaturierung	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	55°C	30 s
Extension	72°C	1 min
Finale Extension	72°C	10 min
Zyklen	40	

Reaktionsbedingungen GE 9f +GE 2:

Initiale Denaturierung	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	60°C	30 s
Extension	72°C	30 s
Finale Extension	72°C	10 min
Zyklen	40	

2.10 Amplifikation der Haushaltsgene

Die 7 Haushaltsgene *pheS*, *glyA*, *fumC*, *mdh*, *sucA*, *dnaN* und *atpA* wurden mittels nested PCR amplifiziert. Es wurde der auf Seite 31 beschriebene Standardreaktionsansatz verwendet. Als äußere Primer wurden die mit 1f (alternativ 1f a oder 1f deg) bezeichneten Vorwärtsprimer sowie die mit 2r (alternativ 2r a, 2r a deg, 2r deg, oder 2r b) bezeichneten Rückwärtsprimer verwendet. Als innere Primer kamen die mit 3f (alternativ 3f a, 3f b oder 3f deg) bezeichneten Vorwärtsprimer und die mit 4r (alternativ 4r a oder 4r a deg) bezeichneten Rückwärtsprimer zum Einsatz. Alle Reaktionen wurden unter den nachfolgend genannten Bedingungen durchgeführt. Hiervon abweichend wurde für Ansätze mit als ‚deg‘ bezeichneten degenerierten Primern die Annealingtemperatur auf 52°C abgesenkt.

Reaktionsbedingungen:

Initiale Denaturierung	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	54°C	30 s
Extension	72°C	30 s
Finale Extension	72°C	10 min
Zyklen	40	

Die Haushaltsgene hatten ohne Berücksichtigung der Primer Fragmentlängen zwischen 387 bp und 438 bp (Tabelle 6). Die Amplifikate wurden unter Mitführung eines Längenstandards (pUC Mix Marker 8 oder GeneRuler 100 bp DNA Ladder) in einem 2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert.

Tabelle 6: Fragmentlängen der Haushaltsgene

Haushaltsgen	Fragmentlänge	Haushaltsgen	Fragmentlänge
<i>pheS</i>	438 bp	<i>sucA</i>	429 bp
<i>glyA</i>	387 bp	<i>dnaN</i>	405 bp
<i>fumC</i>	411 bp	<i>atpA</i>	420 bp
<i>mdh</i>	387 bp		

2.11 Amplifikation der *ankA* Genfragmente

Die Amplifikation der *ankA* Genfragmente wurde als nested PCR durchgeführt. Hierbei fanden standardmäßig als äußere Primer SLO fo1 und SLO re1 sowie als innere Primer SLO fo2 und SLO re2 Verwendung. Es wurde der auf Seite 31 beschriebene Standardreaktionsansatz verwendet. Je nach *ankA* Clusterzugehörigkeit ergaben sich Fragmentlängen (ohne Primer) zwischen 523 bp und 537 bp (Tabelle 7). Die Amplifikate wurden unter Mitführung eines Längenstandards (pUC Mix Marker 8 oder GeneRuler 100 bp DNA Ladder) in einem 2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert.

Reaktionsbedingungen SLO fo1 + SLO re1:

Initiale Denaturierung	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	52°C	30 s
Extension	72°C	1 min
Finale Extension	72°C	10 min
Zyklen	40	

Reaktionsbedingungen SLO fo2 + SLO re2

Initiale Denaturierung	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	52°C	30 s
Extension	72°C	30 s
Finale Extension	72°C	10 min
Zyklen	40	

Tabelle 7: *ankA* Fragmentlängen abhängig vom *ankA* Cluster

<i>ankA</i> Cluster	Fragmentlänge	<i>ankA</i> Cluster	Fragmentlänge
1	523 bp	5	535 bp
2	529 bp	6*	528 bp
3	537 bp	7*	523 bp
4	535 bp		

*Erstbeschreibung im Rahmen dieser Arbeit

Im Falle von Doppelinfectionen und bei Versagen der Standardprimer kamen clusterspezifische *ankA* Primer bei unveränderten Reaktionsbedingungen zum Einsatz (Tabelle 8).

Tabelle 8: Primerkombinationen zur clusterspezifischen Amplifikation von *ankA*

<i>ankA</i> Cluster	Äußere Primer	Innere Primer
1	SLO fo1 I + SLO re1 I	SLO fo2 I + SLO re2 I
2	SLO fo1 II + SLO re1 II + III	SLO fo2 II + III + SLO re2 II + III
3	SLO fo1 III + SLO re1 II + III	SLO fo2 II + III + SLO re2 II + III
4	SLO fo1 IV + SLO re1 IV	SLO fo2 IV + SLO re2 IV

2.12 Amplifikation des *ankA* ORF des Clusters 6

Für den hier erstmalig beschriebenen *ankA* Cluster 6 wurde die Sequenz des *ankA* ORF mittels Primerwalking ermittelt. Die Teilfragmente wurden als nested PCR unter Verwendung des Standardreaktionsansatzes (Seite 31) und der in Tabelle 9 aufgeführten Primerkombinationen und Reaktionsbedingungen amplifiziert. Anschließend wurden die Amplifikate bidirektional (siehe 2.15) sequenziert und die Contigs mit Hilfe des Programms SeqMan Pro 15 aneinandergereiht.

Reaktionsbedingungen:

Initiale Denaturierung	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	siehe Tabelle 9	
Extension	siehe Tabelle 9	
Finale Extension	72°C	10 min
Zyklen	40	

Tabelle 9: Primerkombinationen und Reaktionsbedingungen zur Amplifikation des *ankA* Clusters 6

Äußere Primer	Annealing – Elongation	Innere Primer	Annealing – Elongation
Nager U8 + Amsel beg re1	50°C 30 s – 72°C 2 min	Nager U8 + Amsel beg re2	50°C 30 s – 72°C 2 min
SLO fo1 + SLO re1	52°C 30 s – 72°C 1 min	SLO fo1 + Amsel beg re1	52°C 30 s – 72°C 30 s
SLO fo1 + SLO re1	52°C 30 s – 72°C 1 min	SLO fo2 + SLO re2	52°C 30 s – 72°C 30 s
Amsel mi fo1 + D5	52°C 30 s – 72°C 2min	Amsel mi fo2 + D5	52°C 30 s – 72°C 2 min

Das nested PCR-Produkt aus Amsel mi fo2 + D5 wurde zusätzlich zu den Primern Amsel mi fo2 und D5 auch mit den Primern Amsel mi seq fo1, Amsel mi seq fo2 und Amsel mi seq re 2 sequenziert. Die Position der verschiedenen Amplifikate ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

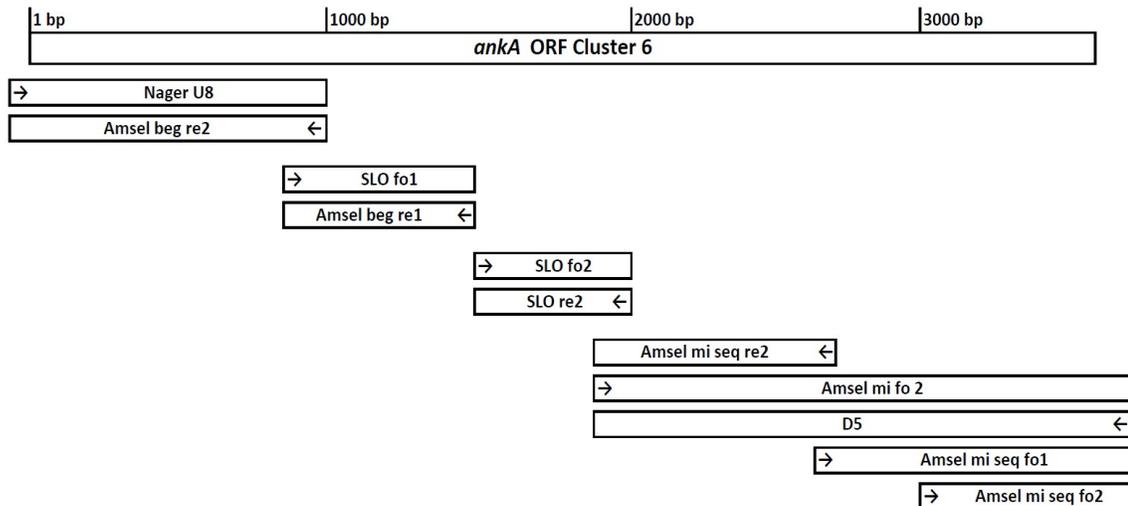


Abbildung 6: Position der vier Amplifikate, die zur Sequenzierung des *ankA* ORF des Clusters 6 generiert wurden

2.13 Amplifikation des *ankA* ORF des Clusters 7

Die Teilfragmente wurden als nested PCR unter Verwendung des Standardreaktionsansatzes (Seite 31) und den in Tabelle 10 aufgeführten Primerkombinationen [101] amplifiziert. Alle Reaktionen wurden unter den nachfolgend beschriebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Anschließend wurden die Amplifikate bidirektional (siehe 2.15) sequenziert und die Contigs mit Hilfe des Programms SeqMan Pro 15 aneinandergereiht. Die Position der verschiedenen Amplifikate ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

Reaktionsbedingungen:

Initiale Denaturierung	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	52°C	30 s
Extension	72°C	2 min
Finale Extension	72°C	10 min
Zyklen	40	

Tabelle 10: Primerkombinationen zur Amplifikation des *ankA* Clusters 7

Äußere Primer	Innere Primer
U8 + 1R1 neu	U8 + 1R7
U8 + 1R1 neu	U5 neu + 1R4 neu
U8 + 1R1 neu	U3 + 1R2
1F neu + 4R1 mod	1F neu + 1R neu
1F neu + 4R1 mod	2F1 neu + 4R1 mod
4F1 neu seq3 + D1	4F2 neu + D1

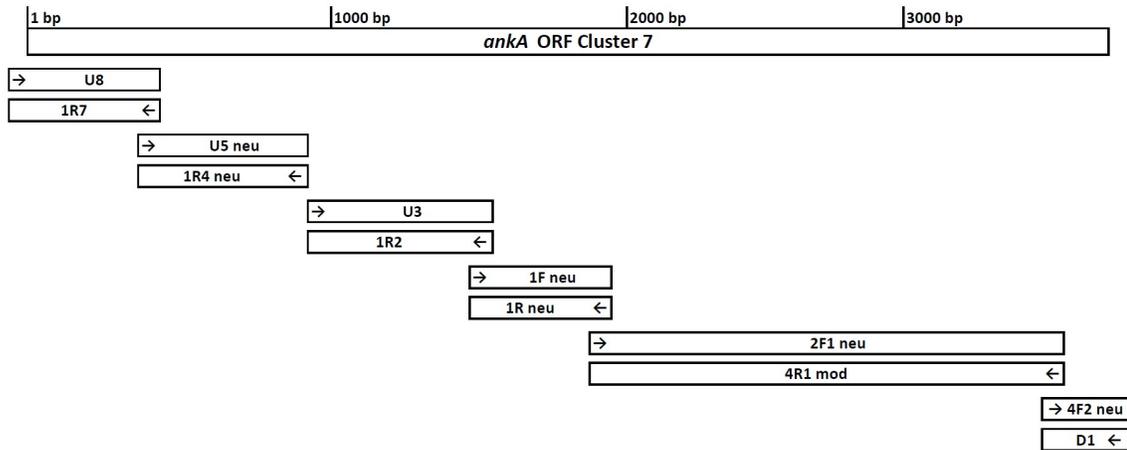


Abbildung 7: Position der sechs Amplifikate, die zur Sequenzierung des *ankA* ORF des Clusters 7 generiert wurden

2.14 Amplifikation des *drhm* Gens und des APH_0919/APH_0922 Genlocus

Wenn bei einem *A. phagocytophilum* Stamm eine Deletion des *drhm* Gens vorliegt (Abbildung 5), kann dieses nicht mittels PCR amplifiziert werden. Ein negatives PCR-Ergebnis kann jedoch auch durch Mutation der Primerbindungsstellen oder Inhibitionseignisse bedingt sein. Um zu prüfen, ob die das *drhm* Gen enthaltende Region im Genom der untersuchten *A. phagocytophilum* Stämme vorkommt, wurde daher die Existenz des APH_0919/APH_0922 Genlocus untersucht.

Die Amplifikation von *drhm* und APH_0919/APH_0922 wurde als nested PCR durchgeführt. Für das *drhm* Gen wurden als äußere Primer *drhm* 1f und *drhm* 2r sowie als innere Primer *drhm* 3f und *drhm* 4r verwendet. Für APH_0919/APH_0922 wurden als äußere Primer APH_0919 1f und APH_0919 2r sowie als innere Primer APH_0919 3f und APH_0919 4r benutzt. Der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen waren dieselben, die unter 2.10 für die Amplifikation der Haushaltsgene beschrieben sind. Die Fragmentlänge (ohne Primer) betrug für *drhm* 351 bp und für APH_0919/APH_0922 438 bp (Abbildung 8). Die Amplifikate wurden unter Mitführung eines Längenstandards (pUC Mix Marker 8 oder GeneRuler 100 bp DNA Ladder) in einem 2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert. Um die Spezifität beider PCR zu prüfen, wurden vereinzelte Amplifikate sequenziert. Für die Auswertung wurden in 11 weiteren Fällen Datensätze aus der Genbank übernommen (siehe 3.4).

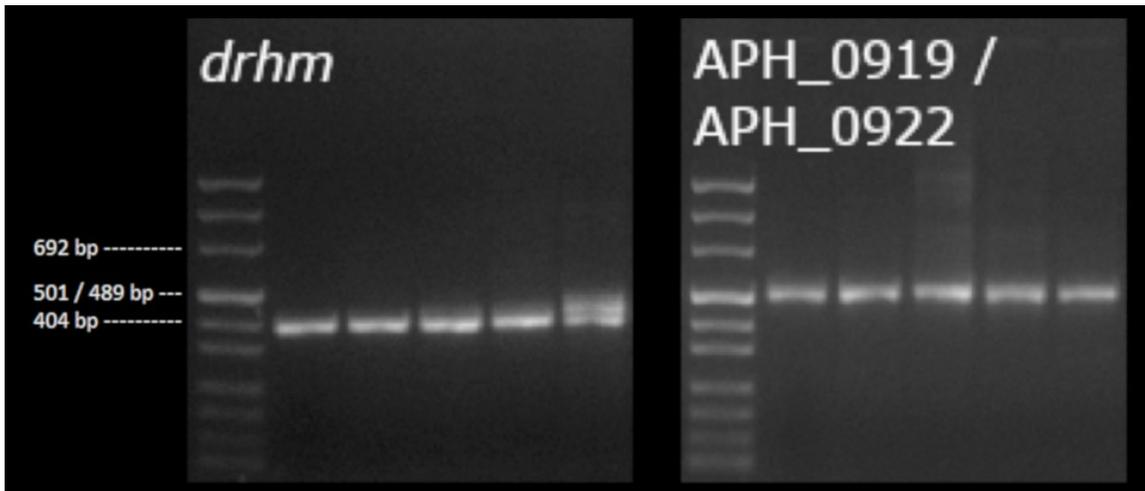


Abbildung 8: Agarose-Gelelektrophorese für Amplifikate des *drhm* Gens (links) und des APH_0919/APH_0922 Genlocus (rechts)

2.15 Aufreinigung der Amplifikate und Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden mittels ExoSAP-IT aufgereinigt. Dazu wurden 20 µl PCR-Produkt und 2 µl ExoSAP-IT gemischt und 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte ein Inaktivierungsschritt bei 80°C für 15 min. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Amplifikate bidirektional mit den inneren PCR-Primern nach der Sanger-Methode sequenziert. Hierfür wurde der Sequenzierdienstleister Eurofins Genomics (Konstanz) in Anspruch genommen.

2.16 Chromatogramm-Analyse

Für die Sequenzanalyse wurde soweit nicht anders beschrieben das Programm TraceEditPro verwendet. Primersequenzen wurden softwareseitig automatisch entfernt. Vorwärts- und Rückwärtssequenz wurden übereinandergelegt und hinsichtlich Signalqualität, Ambiguität und Fehlerhaftigkeit überprüft. Wenn Ambiguitäten sowohl in der Vorwärts- als auch der Rückwärtssequenz auftraten, wurden diese nicht aufgelöst und als Doppelinfektion mit verschiedenen *A. phagocytophilum* Stämmen interpretiert (Abbildung 9). Bei ungenügender Sequenzqualität erfolgte eine Wiederholungsuntersuchung.

Die Konsensussequenzen der Haushaltsgene wurden mit einer Allel-Datenbank abgeglichen. Bisher unbekanntem Allelen wurde in der zeitlichen Reihenfolge ihres Auftretens eine aufsteigende Nummer zugeordnet. Die *ankA* Sequenzen wurden mit clusterspezifischen Referenzsequenzen abgeglichen. Die Zuordnung zu einem

Cluster erfolgte bei einer Übereinstimmung von $\geq 90\%$ mit der entsprechenden Referenzsequenz.

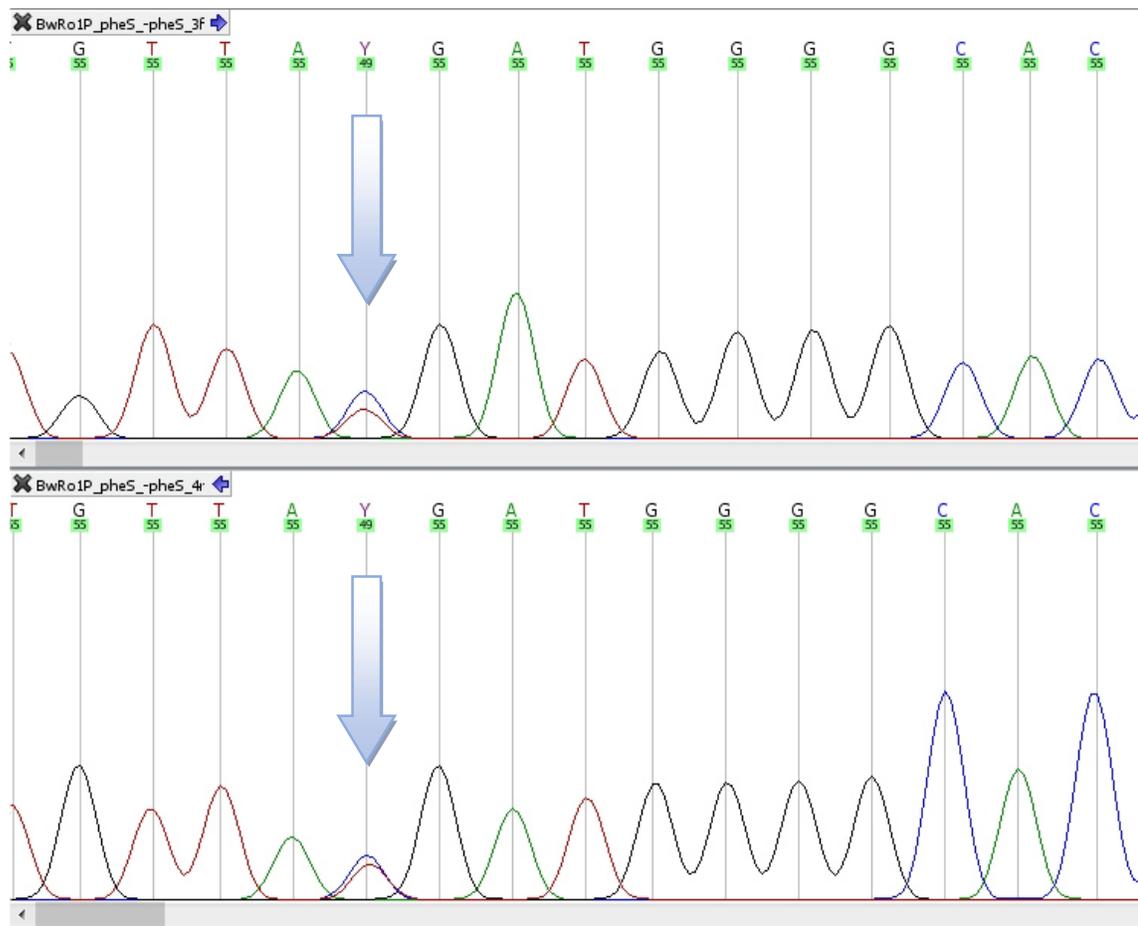


Abbildung 9: Ambiguität im Chromatogramm des *pheS* Allels der Probe red_deer_Ro1P in Vorwärts- (3f) und Rückwärtsstrang (4r) an Position 221 (Pfeile). X-Achse: Detektionszeit, Y-Achse: Fluoreszenzsignal, A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin

2.17 Datenverfügbarkeit

Proben mit vollständigem MLST-Profil wurden in die PubMLST Datenbank für *A. phagocytophilum* (<https://pubmlst.org/aphagocytophilum/>) eingegeben. Alle Haushaltsgen- und *ankA* Sequenzen wurden in die GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) eingetragen.

2.18 Phylogenetische Analyse

Für die sequenzbasierte MLST-Analyse wurden die Sequenzen aller 7 Haushaltsgene in der Abfolge *pheS*, *glyA*, *fumC*, *mdh*, *sucA*, *dnaN* und *atpA* aneinandergereiht (Konkatenation) [121]. Es ergab sich eine artifizielle Gesamtsequenz von 2877 bp. Für die Analyse der *ankA* Sequenzen wurden Positionen mit gaps nicht berücksichtigt.

Alignments der Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms MEGA 10.0.5 [128] erzeugt. Es wurde der ClustalW (Codons)-Algorithmus unter Verwendung der PAM (Dayhoff)-Matrix benutzt. Anschließend wurde mittels der Neighbor-Joining (NJ)-Methode unter Anwendung der Jukes-Cantor-Matrix und der ‚complete deletion‘-Option ein phylogenetischer Baum berechnet. Zur Beurteilung der statistischen Signifikanz der Verzweigungen wurde die Bootstrap-Methode mit 1.000 Replikaten angewendet.

Die Bootstrap-Methode ist ein auf Resampling beruhendes statistisches Näherungsverfahren [130]. Aus dem zu analysierenden Datensatz werden zufallsbedingt durch Ziehen mit Zurücklegen n Datensätze identischer Größe generiert und basierend auf diesen n phylogenetische Stammbäume errechnet. Hierbei entspricht n der Anzahl der gewünschten Replikationen [130]. Durch Vergleich der so generierten Bäume ergibt sich für jede Verzweigung ein Prozentwert, der die Häufigkeit ihres Vorkommens beziffert. Bootstrap-Werte $\geq 95\%$ werden als statistisch signifikant betrachtet [130].

Die mittleren Netto-Unterschiede zwischen verschiedenen *ankA* Genclustern wurden unter Anwendung der Jukes-Cantor-Matrix und der ‚complete deletion‘-Option mit Hilfe des Programms MEGA 10.0.5 [128] berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Allel-basierte MLST-Analyse

Vollständige Profile wurden in 66% (114/174) der positiv auf *A. phagocytophilum* getesteten Proben erhalten (Tabelle 11). In 34% (60/174) Fällen gelang dies aufgrund technischer Probleme nicht. In 23% (26/114) wurden Ambiguitäten in einem oder mehreren Allelen gefunden (Tabelle 12). Die Typisierbarkeit betrug damit 77%. Es wurden 101 neue Allele (Tabelle 13) und die 32 neuen ST 221 – 249; 275; 276 und 294 identifiziert. Proben mit vollständigem MLST-Profil wurden in die PubMLST Datenbank für *A. phagocytophilum* (<https://pubmlst.org/aphagocytophilum/>) eingegeben.

Die beim Menschen gefundenen ST 25 und ST 54 kamen auch bei Hunden, Pferden, einer Katze, Wildschweinen und Rotfüchsen vor (Tabelle 11).

Tabelle 11: ST, Allelnummer, MLST und *ankA* Cluster der 114 *A. phagocytophilum* positiven Proben mit vollständigem Profil sowie der Probe bird_0176

Proben	ST	<i>pheS</i>	<i>glyA</i>	<i>fumC</i>	<i>mdh</i>	<i>sucA</i>	<i>dnaN</i>	<i>atpA</i>	Cluster	
									MLST	<i>ankA</i>
1 Amsel										
bird_0176	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6
2 Katzen										
cat_596400	25	27	15	6	2	2	11	7	1	1
cat_971	242	27	33	6	55	2	66	61	1	1
21 Rinder										
cow_14_0406	243	105	79	3	4	11	2	1	1	1
cow_22_0907	244	53	2	68	4	11	2	1	1	1
cow_22_1610	245	101	2	3	4	11	65	2	1	1
cow_22_3005	243	105	79	3	4	11	2	1	1	1
cow_28_0310	245	101	2	3	4	11	65	2	1	1
cow_30_0406	243	105	79	3	4	11	2	1	1	1
cow_30_1705	244	53	2	68	4	11	2	1	1	1
cow_30_2506	275	105	79	68	4	11	2	7	1	1
cow_35_1705	243	105	79	3	4	11	2	1	1	1
cow_36_1905	243	105	79	3	4	11	2	1	1	1

Proben	ST	<i>pheS</i>	<i>glyA</i>	<i>fumC</i>	<i>mdh</i>	<i>sucA</i>	<i>dnaN</i>	<i>atpA</i>	Cluster	
									MLST	<i>ankA</i>
cow_46_2205	243	105	79	3	4	11	2	1	1	1
cow_46_2506	244	53	2	68	4	11	2	1	1	1
cow_49_1905	245	101	2	3	4	11	65	2	1	1
cow_52_1809	245	101	2	3	4	11	65	2	1	1
cow_53_2506	243	105	79	3	4	11	2	1	1	1
cow_57_0406	243	105	79	3	4	11	2	1	1	1
cow_58_1705	243	105	79	3	4	11	2	1	1	1
cow_59_0409	246	81	16	17	13	15	13	9	2	2
cow_61_2206	243	105	79	3	4	11	2	1	1	1
cow_7_2506	243	105	79	3	4	11	2	1	1	1
cow_A287	205	102	13	69	8	63	30	3	1	1
13 Hunde										
dog_126418	NT	27	15	6	3	NT	27	7	1	1
dog_555277	55	27	15	6	3	2	27	7	1	1
dog_594819	25	27	15	6	2	2	11	7	1	1
dog_597576	25	27	15	6	2	2	11	7	1	1
dog_601717	54	27	15	6	3	2	11	7	1	1
dog_602430	25	27	15	6	2	2	11	7	1	1
dog_602741	25	27	15	6	2	2	11	7	1	1
dog_660279	25	27	15	6	2	2	11	7	1	1
dog_723471	25	27	15	6	2	2	11	7	1	1
dog_747278	25	27	15	6	2	2	11	7	1	1
dog_752482	54	27	15	6	3	2	11	7	1	1
dog_Nico S36457_13	25	27	15	6	2	2	11	7	1	1
dog_rosa isolate	276	27	15	38	2	2	11	76	1	1
4 Damhirsche										
fallow_deer_1	NT	1	33	NT	4	2	NT	NT	1	1
fallow_deer_3	NT	1	82	73	3	2	NT	1	1	4
fallow_deer_7	232	1	83	74	21	5	80	28	1	4
fallow_deer_8	233	7	33	6	8	98	2	2	1	4
5 Ziegen										

Proben	ST	<i>pheS</i>	<i>glyA</i>	<i>fumC</i>	<i>mdh</i>	<i>sucA</i>	<i>dnaN</i>	<i>atpA</i>	Cluster	
									MLST	<i>ankA</i>
goat_31298	221	106	80	3	4	5	79	1	1	4
goat_A8July	55	27	15	6	3	2	27	7	1	1
goat_B10June	222	98	81	20	13	114	17	9	2	4
goat_B11June	223	29	16	18	13	97	17	16	2	2
goat_M8October	224	2	84	18	13	99	13	62	2	4
18 Pferde										
horse_11523712	55	27	15	6	3	2	27	7	1	1
horse_11527691	228	49	1	81	4	88	7	2	1	4
horse_1187640	54	27	15	6	3	2	11	7	1	1
horse_689227	54	27	15	6	3	2	11	7	1	1
horse_S1025_09	227	27	95	6	3	2	11	7	1	1
horse_S1071_08	54	27	15	6	3	2	11	7	1	1
horse_S1074_09	54	27	15	6	3	2	11	7	1	1
horse_S1085_09	54	27	15	6	3	2	11	7	1	1
horse_S1201_05	225	111	33	3	56	2	83	1	1	1
horse_S1220_08	54	27	15	6	3	2	11	7	1	1
horse_S1379_06	54	27	15	6	3	2	11	7	1	1
horse_S1523_07	226	110	92	29	3	2	66	1	1	7
horse_S1729_08	55	27	15	6	3	2	27	7	1	1
horse_S1741_07	25	27	15	6	2	2	11	7	1	1
horse_S1829_04	25	27	15	6	2	2	11	7	1	1
horse_S2614_07	25	27	15	6	2	2	11	7	1	1
horse_S2630_07	54	27	15	6	3	2	11	7	1	1
horse_S654_04	25	27	15	6	2	2	11	7	1	1
3 Menschen										
human_451	54	27	15	6	3	2	11	7	1	1
human_472	54	27	15	6	3	2	11	7	1	1
human_Slovenia	25	27	15	6	2	2	11	7	1	1
2 Steinböcke										
ibex_5	231	27	86	77	21	101	81	1	1	4
ibex_6	231	27	86	77	21	101	81	1	1	4
4 Mufflons										

Proben	ST	<i>pheS</i>	<i>glyA</i>	<i>fumC</i>	<i>mdh</i>	<i>sucA</i>	<i>dnaN</i>	<i>atpA</i>	Cluster	
									MLST	<i>ankA</i>
mouflon_3	NT	NT	NT	NT	4	NT	NT	1	1	4
mouflon_4	NT	NT	5	6	3	100	7	1	1	4
mouflon_7	NT	NT	NT	10	NT	NT	NT	NT	1	4
mouflon_10	NT	NT	NT	NT	NT	116	1	NT	1	4
18 Rothirsche										
red_deer_M19	NT	NT	87	NT	4	109	91	NT	1	4
red_deer_M22	NT	1	NT	NT	4	54	49	NT	1	4
red_deer_M23	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	19	1	1
red_deer_M5	NT	NT	NT	3	21	NT	49	2	1	4
red_deer_M6	229	116	15	7	7	54	27	19	1	4
red_deer_M8	230	107	39	7	21	11	30	2	1	4
red_deer_M9	231	27	86	77	21	101	81	1	1	4
red_deer_Ro1	NT	NT	NT	NT	NT	NT	27	19	1	4
red_deer_Ro14	294	112	33	6	4	106	49	1	1	1
red_deer_Ro15	NT	NT	NT	NT	5	NT	NT	1	1	1,4
red_deer_Ro18	NT	NT	NT	NT	5	88	NT	NT	1	4
red_deer_Ro1P	NT	NT	33	87	5	103	27	NT	1	4
red_deer_Ro2	234	27	94	81	8	43	88	68	1	1,4
red_deer_Ro3	NT	109	33	3	59	110	NT	NT	1	4
red_deer_Ro4	235	3	88	84	4	111	15	19	2	3
red_deer_Ro5	NT	NT	33	7	NT	NT	NT	NT	1	1
red_deer_Ro6	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	1	4
red_deer_Ro9	236	7	89	12	4	112	84	1	1	1,3,4
2 Rotfüchse										
red_fox_0079	54	27	15	6	3	2	11	7	1	1
red_fox_0115	54	27	15	6	3	2	11	7	1	1
7 Rehe										
roe_deer_0185	NT	119	NT	18	42	113	13	11	2	2
roe_deer_0359	NT	31	NT	NT	13	NT	13	NT	2	2
roe_deer_0568	NT	120	NT	18	13	15	NT	10	2	2
roe_deer_0571	NT	33	NT	18	13	NT	13	NT	2	2
roe_deer_457	NT	108	16	NT	13	NT	NT	NT	2	2

Proben	ST	<i>pheS</i>	<i>glyA</i>	<i>fumC</i>	<i>mdh</i>	<i>sucA</i>	<i>dnaN</i>	<i>atpA</i>	Cluster	
									MLST	<i>ankA</i>
roe_deer_510	247	39	16	20	17	66	73	63	2	2
roe_deer_546	NT	11	NT	18	13	105	13	9	2	2
7 Sikahirsche										
sika_deer_11	239	27	33	78	4	102	19	19	1	3
sika_deer_12	240	1	33	38	4	103	85	1	1	1
sika_deer_17	241	114	33	82	58	2	86	19	1	1
sika_deer_3	NT	NT	NT	73	NT	98	49	1	1	1
sika_deer_5	NT	1	33	79	5	NT	48	1	1	1,3,4
sika_deer_7	237	1	33	82	21	104	66	1	1	1
sika_deer_9	238	122	16	18	13	15	89	16	2	2
2 I. ricinus von Amseln										
tick_CM20	248	118	91	83	57	96	78	65	7	6
tick_CS2	248	118	91	83	57	96	78	65	7	6
1 I. frontalis von der Amsel										
tick_CS3	249	117	20	18	13	24	17	30	2	2
5 Wildschweine										
wild_boar_0242	58	27	15	6	3	39	27	7	1	1
wild_boar_0254	54	27	15	6	3	2	11	7	1	1
wild_boar_0261	54	27	15	6	3	2	11	7	1	1
wild_boar_0351	54	27	15	6	3	2	11	7	1	1
wild_boar_0361	25	27	15	6	2	2	11	7	1	1

NT = nicht typisierbar; ND = nicht durchgeführt, Loci mit Ambiguitäten sind rot dargestellt

Tabelle 12: Proben mit Ambiguitäten in einem oder mehreren Haushaltsgenloci

Probe	Loci mit Ambiguitäten
1 Hund	
dog_126418	<i>sucA</i>
2 Damhirsche	
fallow_deer_1	<i>fumC, dnaN, atpA</i>
fallow_deer_3	<i>dnaN</i>
4 Mufflons	
mouflon_3	<i>pheS, glyA, fumC, sucA, dnaN</i>
mouflon_4	<i>pheS</i>
mouflon_7	<i>pheS, glyA, mdh, sucA, dnaN, atpA</i>
mouflon_10	<i>pheS, glyA, fumC, mdh, atpA</i>
11 Rothirsche	
red_deer_M19	<i>pheS, fumC, atpA</i>
red_deer_M22	<i>glyA, fumC, atpA</i>
red_deer_M23	<i>pheS, glyA, fumC, mdh, sucA, dnaN</i>
red_deer_M5	<i>pheS, glyA, sucA</i>
red_deer_Ro1	<i>pheS, glyA, fumC, mdh, sucA</i>
red_deer_Ro15	<i>pheS, glyA, fumC, sucA, dnaN</i>
red_deer_Ro18	<i>pheS, glyA, fumC, dnaN, atpA</i>
red_deer_Ro1P	<i>pheS, atpA</i>
red_deer_Ro3	<i>dnaN, atpA</i>
red_deer_Ro5	<i>pheS, mdh, sucA, dnaN, atpA</i>
red_deer_Ro6	<i>pheS, glyA, fumC, mdh, sucA, dnaN, atpA</i>
6 Rehe	
roe_deer_0185	<i>glyA</i>
roe_deer_0359	<i>glyA, fumC, sucA, atpA</i>
roe_deer_0568	<i>glyA, dnaN</i>
roe_deer_0571	<i>glyA, sucA, atpA</i>
roe_deer_457	<i>fumC, sucA, dnaN, atpA</i>
roe_deer_546	<i>glyA</i>
2 Sikahirsche	
sika_deer_3	<i>pheS, glyA, mdh</i>
sika_deer_5	<i>sucA</i>

Tabelle 13: Im Rahmen dieser Arbeit neu detektierte Haushaltsgen-Allele

Haushaltsgen	Anzahl (n)	Allelnummern
<i>pheS</i>	17	106 - 122
<i>glyA</i>	20	79 - 98
<i>fumC</i>	15	73 - 87
<i>mdh</i>	6	55 - 60
<i>sucA</i>	21	96 - 116
<i>dnaN</i>	14	78 - 91
<i>atpA</i>	8	61 - 68

3.2 Sequenz-basierte MLST-Analyse

Die konkatenierten Haushaltsgensequenzen der 114 *A. phagocytophilum* Stämme mit vollständigem Profil (Tabelle 11) wurden verwendet, um mittels NJ-Algorithmus einen phylogenetischen Baum zu konstruieren (Abbildung 10). Es ergab sich eine Separation der *A. phagocytophilum* Stämme in 3 Cluster (Abbildung 10), die von hohen Bootstrap-Werten von $\geq 92\%$ gestützt wurde, obwohl nicht für alle Verzweigungen die statistische Signifikanz von 95% erreicht wurde. Cluster 1 und Cluster 2 waren bereits aus der Literatur bekannt [62]. Zum MLST Cluster 1 gehörten Stämme von Menschen, Hunden, Katzen, Pferden, Rindern und Ziegen sowie von Rothirschen, Sikahirschen, Damhirschen, Mufflons, Steinböcken, Wildschweinen und Rotfüchsen. MLST Cluster 2 beherbergte Proben vom Rind, von Ziegen, Rehen, vom Sikahirsch und von der Zecke. Cluster 3, 4, 5 und 6 sind aus der Literatur bekannt [62, 131-133]. In der hier vorliegenden Studie wurden jedoch keine Proben gefunden, die zu diesen Clustern gehörten. MLST Cluster 7 (Abbildung 10) wurde in Rahmen dieser Arbeit neu beschrieben und beinhaltete zwei angesogene *I. ricinus* Zecken von Amseln (*T. merula*).

Zur Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit in den Gesamtkontext wurde ein phylogenetischer NJ-Baum berechnet, in den bereits publizierte und über PubMLST (<https://pubmlst.org/aphagocytophilum/>) verfügbare Sequenzen einbezogen wurden (Abbildung 11). Es wurden nur Sequenzen ohne Ambiguitäten berücksichtigt.

Es ergab sich eine Separation der *A. phagocytophilum* Stämme in 6 Cluster (Abbildung 11), die mehrheitlich von hohen Bootstrap-Werten von $\geq 99\%$ statistisch gestützt wurde. Cluster 1 enthielt Stämme vom Menschen, von Haustieren (Hunde, Pferde, Katzen), Nutztieren (Rinder, Schafe, Ziegen), Wildtieren (Rothirsche,

Sikahirsche, Damhirsche, Europäische Bisons, einer Gämse, Steinböcken, Wildschweinen, Rotfüchsen), Kleinsäugetern (Igel, Wiesenhüpfmaus (*Zapus hudsonius*), Streifen-Backenhörnchen (*Tamias striatus*)) und *I. ricinus* Zecken. Cluster 2 war im Wesentlichen auf Rehe und *I. ricinus* Zecken beschränkt, beherbergte jedoch sporadisch Sequenzen von Haustieren (Rind, Ziegen, Wasserbüffel). Cluster 3 enthielt ausschließlich Stämme von Wühl- und Spitzmäusen. Cluster 4 war auf wenige Proben von Rehen und einem Hirsch beschränkt. Cluster 5 und 6 wurden in der Literatur beschrieben [131, 132], im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht berücksichtigt. Cluster 7 enthielt 2 angesogenen *I. ricinus* Zecken von Amseln (*T. merula*). Cluster 8 war auf 3 Stämme von *I. scapularis* aus den USA beschränkt, die als nicht-humanpathogene Ap-V1 Varianten beschrieben wurden [134]. Die übrigen Proben aus den USA vom Menschen und von je einem Stamm vom Hund, Pferd, Streifen-Backenhörnchen und Wiesenhüpfmaus gehörten zum Cluster 1.

Cluster 1 enthielt als einziger Cluster Stämme aus Europa und den USA. Die übrigen Proben aus Europa verteilten sich auf die Cluster 2, 3, 4 und 7. Cluster 8 war auf Proben aus den USA beschränkt.

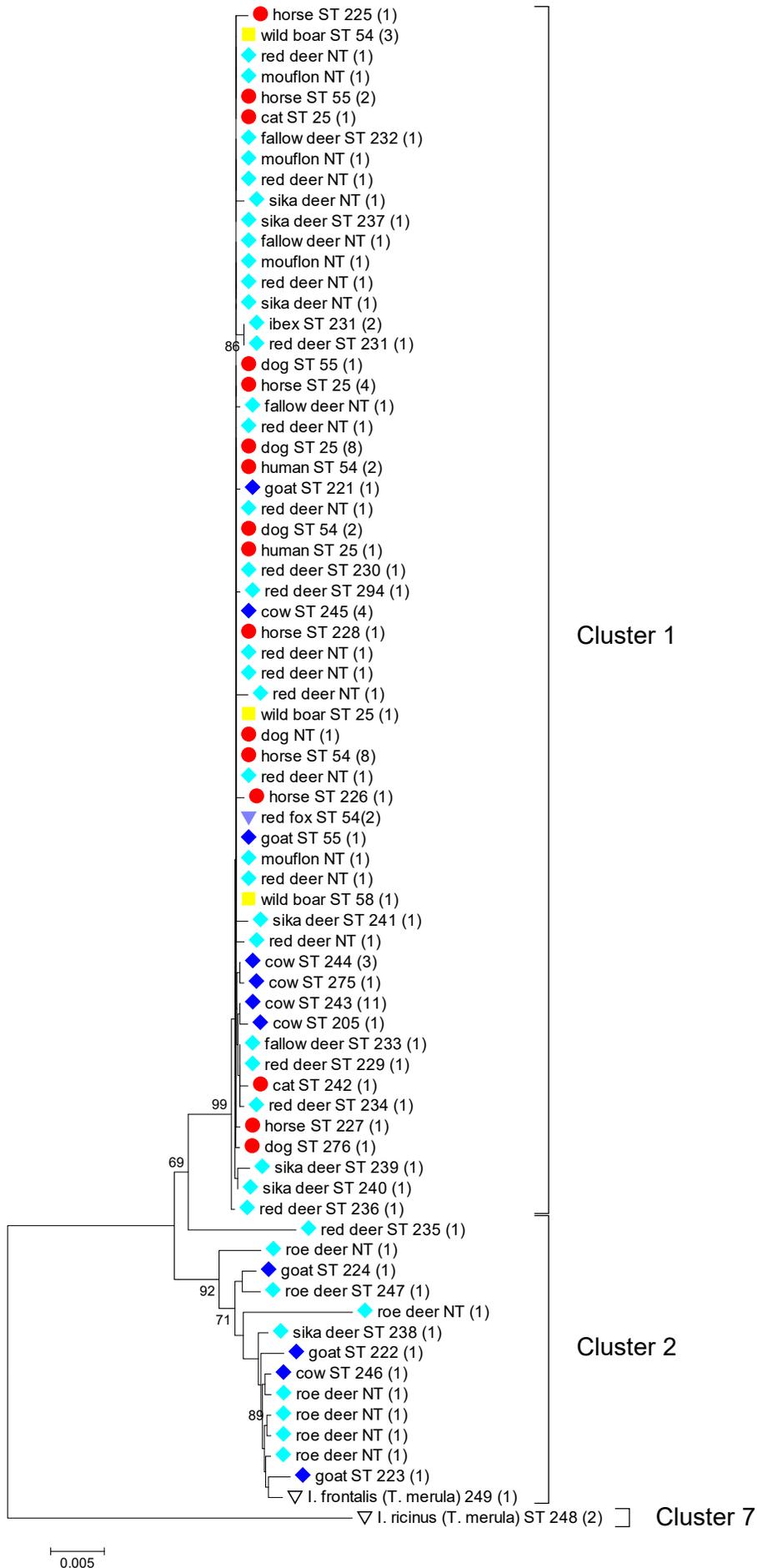
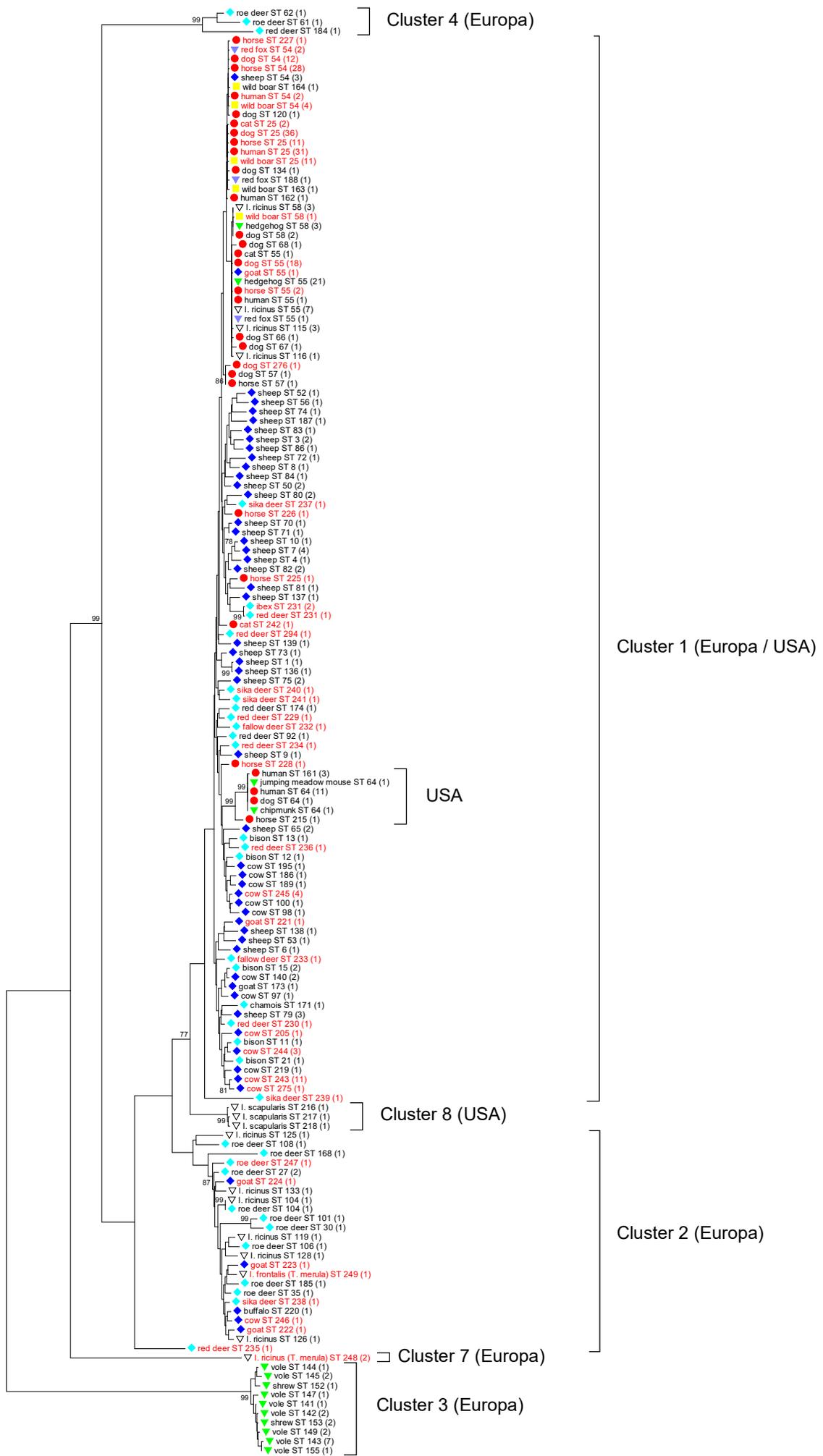


Abbildung 10: NJ-Baum der konkatenierten Haushaltsgensequenzen der 114 *A. phagocytophilum* positiven Proben mit vollständigem Profil. Proben mit Ambiguitäten (NT = nicht typisierbar) wurden berücksichtigt. Jeder ST ist pro Spezies nur einmal dargestellt. Die Anzahl der jeweiligen Stämme ist in Klammern angegeben. Der Maßstab entspricht der Anzahl ausgetauschter Basen je Position. Es sind nur Bootstrapwerte $\geq 69\%$ dargestellt.

- = Sequenzen von Menschen und Haustieren (Hunde, Pferde, Katzen)
- = Sequenzen von Wildschweinen
- ▼ = Sequenzen von Rotfüchsen
- ▽ = Sequenzen von Zecken
- ◆ = Sequenzen von Nutztieren (Rinder, Ziegen)
- ◆ = Sequenzen von Wildwiederkäuern (Rehe, Hirsche, Sikahirsche, Damhirsche, Mufflons, Steinböcke)



0.01

Abbildung 11: NJ-Baum der konkatenierten Haushaltsgensequenzen der 114 *A. phagocytophilum* positiven Proben mit vollständigem Profil sowie von in PubMLST eingetragenen Sequenzen. Es wurden nur Sequenzen ohne Ambiguitäten berücksichtigt. Proben, die im Rahmen dieser Arbeit vollständig charakterisiert werden konnten (Tabelle 11), sind rot hinterlegt. Jeder ST ist pro Spezies nur einmal dargestellt. Die Anzahl der jeweiligen Stämme ist in Klammern angegeben. Der Maßstab entspricht der Anzahl ausgetauschter Basen je Position. Es sind nur Bootstrapwerte $\geq 77\%$ dargestellt.

● = Sequenzen von Menschen und Haustieren (Hunde, Pferde, Katzen)

■ = Sequenzen von Wildschweinen

▼ = Sequenzen von Rotfüchsen

▼ = Sequenzen von Kleinsäugetieren (Igel, Wühlmäuse, Spitzmäuse, Streifen-Backenhörnchen, Wiesenhüpfmaus)

▽ = Sequenzen von Zecken

◆ = Sequenzen von Nutztieren (Rinder, Schafe, Ziegen, Wasserbüffel)

◆ = Sequenzen von Wildwiederkäuern (Rehe, Hirsche, Sikahirsche, Damhirsche, Europäische Bisons, Gämse, Steinböcke)

3.3 *ankA*-basierte Typisierung

Vollständige Profile wurden in 66% (114/174) der positiv auf *A. phagocytophilum* getesteten Proben erhalten (Tabelle 11). In 34% (60/174) Fällen gelang dies aufgrund technischer Probleme nicht. Vier Proben (red_deer_Ro15, red_deer_Ro2, red_deer_Ro9 und sika_deer_5) enthielten *ankA* Sequenzen, die zu verschiedenen *ankA* Clustern gehörten (Tabelle 11). Es handelte sich um zwei Doppel- und zwei Dreifachinfektionen, die durch die Verwendung clusterspezifischer *ankA* Primer nachgewiesen wurden. Für die Probe bird_0176 konnte nur das *ankA* Gen amplifiziert und sequenziert werden, ein MLST-Profil war nicht bestimmbar. Aufgrund der Heterogenität dieser Probe im Vergleich zu allen bisher bekannten *ankA* Sequenzen, wurde sie dennoch in die Auswertung einbezogen.

Die 121 *ankA* Sequenzen der 115 Stämme wurden verwendet, um einen NJ-Baum zu berechnen (Abbildung 12). Die phylogenetische Auswertung ergab eine Separation der *A. phagocytophilum* Stämme in 6 Cluster, die von Bootstrap-Werten von 100% gestützt wurde. Die Cluster 1 – 5 wurden bereits beschrieben [62, 117]. *ankA* Cluster 6 und 7 wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig identifiziert.

Cluster 1 enthielt Sequenzen von Menschen, Haustieren (Hunde, Pferde, Katzen), Nutztieren (Rinder, Ziege) und Wildtieren (Rothirsche, Sikahirsche, Damhirsch, Wildschweine, Rotfuchse). In Cluster 2 wurden vor allem Stämme von Wildwiederkäuern (Rehe, Sikahirsch) und von der Zecke gefunden, jedoch auch solche von Nutztieren (Rind, Ziege). Cluster 3 beinhaltete Sequenzen von 2 Rothirschen und 2 Sikahirschen. In Cluster 4 wurden Proben vom Pferd, von Wildwiederkäuern (Rothirsche, Sikahirsch, Damhirsche, Mufflons, Steinböcke) sowie von Ziegen gefunden. Cluster 6 enthielt einen Stamm von einer Amsel (*T. merula*) und 2 Stämme von *I. ricinus* Zecken (tick_CM20, tick_CS2), die bei Amseln gesaugt hatten. Cluster 7 bestand nur aus einer Probe (horse_S1523_07), die vom Pferd gewonnen wurde.

Zur Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit in den Gesamtkontext wurde ein phylogenetischer NJ-Baum berechnet, der bereits publizierte und in der GenBank hinterlegte Sequenzen enthielt. Es zeigte sich eine Separation in 9 Cluster, die mehrheitlich von Bootstrap-Werten $\geq 99\%$ statistisch gestützt wurde. Die Cluster 1 – 5 [62, 117] sowie 8 – 10 [132, 135] wurden bereits beschrieben. Sequenzen, die zu den Clustern 8 – 10 gehörten, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden.

Stämme die die Cluster 6 und 7 bildeten wurden hier erstmalig beschrieben. Ebenso konnten erstmalig die Cluster 11 und 12 abgegrenzt werden. Cluster 1 enthielt Stämme von Menschen, Haustieren (Hunde, Pferde, Katzen), Nutztieren (Rindern, Schafen, einer Ziege), Wildtieren (Rothirsche, Sikahirsche, Damhirsche, Europäische Bisons, einer Gämse, Wildschweine, Rotfüchse), Kleinsäugetern (Igel) und *I. ricinus* Zecken. Cluster 2 beinhaltete vor allem Sequenzen von Rehen und *I. ricinus* Zecken, jedoch vereinzelt auch solche von Haustieren (jeweils ein Rind, eine Ziege und ein Wasserbüffel). In ähnlicher Weise wurden im Cluster 3 hauptsächlich Proben vom Reh gefunden.

Die Sequenzen von 4 Rothirschen und von 2 Sikahirschen gehörten jedoch ebenfalls zum Cluster 3. Cluster 4 enthielt einen Stamm vom Pferd sowie Stämme von Nutztieren (Rinder, Schafe, Ziegen), Wildwiederkäuern (Rothirsche, Sikahirsche, Damhirsche, Rehe, Europäische Bisons, Mufflons, einer Gämse, Steinböcke) und *I. ricinus* Zecken. Cluster 5 war auf Sequenzen von Wühl- und Spitzmäusen beschränkt. Cluster 6 beinhaltete eine Probe von der Amsel (*T. merula*) und 2 Stämme von *I. ricinus* Zecken, die an Amseln gesaugt hatten. Cluster 7 bestand nur aus einer Sequenz vom Pferd und 2 Sequenzen von *I. ricinus*. Cluster 11 und 12 enthielten ausschließlich Sequenzen aus den USA. In Cluster 11 wurden Stämme von Menschen, einem Hund, einem Pferd und von Kleinsäugetern (Wiesenhüpfmaus, Streifen-Backenhörnchen) gefunden. Cluster 12 beinhaltete Proben von Menschen und *I. scapularis* Zecken. Drei der Isolate aus *I. scapularis* Zecken wurden als nicht-humanpathogene Ap-V1 Varianten [134] und eines als humanpathogene Variante Ap-ha [111] beschrieben. Proben aus Europa wurden in den Clustern 1 – 7 gefunden und solche aus den USA in den Clustern 11 und 12.

Aufgrund der neuartigen Beschaffenheit der *ankA* Teilsequenzen der *I. ricinus* Zecken tick_CM20 und tick_CS2 sowie der Pferdeprobe horse_S1523_07 wurde deren gesamter ORF mittels Primerwalking sequenziert. Die Menge der Probe bird_0176 reicht hierfür nicht aus. Die Länge des ORF der Probe horse_S1523_07 betrug 3.720 bp und die der Proben tick_CM20 und tick_CS2 3.588 bp. Die *ankA* Sequenz der beiden Stämme von *I. ricinus* war identisch.

Die vollständige *ankA* Sequenz der Pferdeprobe horse_S1523_07 wurde mit allen anderen kompletten *ankA* Sequenzen, die in der GenBank hinterlegt waren [100, 101, 117], verglichen. Die höchsten Identitäten auf Nukleinsäure-Ebene wurden für Sequenzen der *ankA* Cluster 1 (84%) und 4 (86%) gefunden. Wurden jedoch nur die Nukleotide 1 – 1.639 berücksichtigt, ergab sich eine Identität zu den Cluster 1

Sequenzen von 99%. Eine Übereinstimmung von 98% zu den Cluster 4 Sequenzen zeigte sich, wenn die Nukleotide 1.604 – 3.720 in Betracht gezogen wurden.

Abbildung 12: NJ- Baum der 121 *ankA* Sequenzen der 115 *A. phagocytophilum* Stämme. Proben mit Ambiguitäten und solche mit identischer *ankA* Sequenz wurden eingeschlossen. Der Maßstab entspricht der Anzahl ausgetauschter Basen je Position. Es sind nur Bootstrapwerte $\geq 62\%$ dargestellt.

● = Sequenzen von Menschen und Haustieren (Hunde, Pferde, Katzen)

■ = Sequenzen von Wildschweinen

■ = Sequenz von der Amsel

▼ = Sequenzen von Rotfüchsen

▽ = Sequenzen von Zecken

◆ = Sequenzen von Nutztieren (Rinder, Schafe, Ziegen)

◆ = Sequenzen von Wildwiederkäuern (Rehe, Hirsche, Sikahirsche, Damhirsche, Mufflons, Steinböcke)

Abbildung 13: NJ- Baum der 121 *ankA* Sequenzen der 115 *A. phagocytophilum* Stämme sowie von in der GenBank eingetragenen Sequenzen. Die Sequenzen der in Tabelle 11 aufgeführten Proben sind rot hinterlegt. Sequenzen mit Ambiguitäten wurden berücksichtigt. Identische *ankA* Sequenzen sind nur einmal pro Spezies dargestellt. Die Anzahl der jeweiligen Stämme ist in Klammern angegeben. Der Maßstab entspricht der Anzahl ausgetauschter Basen je Position. Es sind nur Bootstrapwerte $\geq 72\%$ dargestellt.

- = Sequenzen von Menschen und Haustieren (Hunde, Pferde, Katzen)
- = Sequenzen von Wildschweinen
- = Sequenz von der Amsel
- ▼ = Sequenzen von Rotfüchsen
- ▼ = Sequenzen von Kleinsäugetern (Igel, Wühlmäuse, Spitzmäuse, Streifen-Backenhörnchen, Wiesenhüpfmaus)
- ▽ = Sequenzen von Zecken
- ◆ = Sequenzen von Nutztieren (Rinder, Schafe, Ziegen, Wasserbüffel)
- ◆ = Sequenzen von Wildwiederkäuern (Rehe, Hirsche, Sikahirsche, Damhirsche, Europäische Bisons; Mufflons, Gämsen, Steinböcke)

3.4 Amplifikation des *drhm* Gens und des APH_0919/APH_0922 Genlocus

Alle 114 *A. phagocytophilum* positiven Proben mit vollständigem Profil wurden auf das Vorhandensein des *drhm* Gens und des APH_0919/APH_0922 Genlocus untersucht (Tabelle 14). Für 42 zusätzliche Proben vom Menschen aus den USA existierten bereits vollständige MLST- und *ankA*-Datensätze, die der Veröffentlichung von Huhn et al. [62] entnommen wurden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diese darüber hinaus hinsichtlich des Vorhandensein des *drhm* Gens und des APH_0919/APH_0922 Genlocus analysiert. 76% (32/42) dieser humanen Stämme waren europäischer und 24% (10/42) nordamerikanischer Herkunft. In weiteren 11 Fällen wurden die entsprechenden Informationen aus der GenBank heruntergeladen (Tabelle 14).

In 2 Proben konnten weder das *drhm* Gen noch der APH_0919/APH_0922 Genlocus amplifiziert werden. Es handelte sich um die beiden *I. ricinus* Zecken, die an Amseln gesaugt hatten. Aufgrund der geringen Homologie ihrer Haushaltsgen- und *ankA* Sequenzen zu den übrigen Sequenzen, dürfte der Grund hierfür am ehesten in Primermismatches liegen.

In 3 weiteren Proben aus Europa konnte trotz vorhandenem APH_0919/APH_0922 Genlocus das *drhm* Gen nicht amplifiziert werden. Dies betraf 2 Proben vom Hund und eine vom Rothirsch.

Alle anderen 141 Stämme aus Europa waren sowohl für *drhm* als auch für den APH_0919/APH_0922 Genlocus positiv. Darunter waren alle 35 Proben vom Menschen aus Europa.

Alle 21 Stämme aus den USA waren für den APH_0919/APH_0922 Genlocus positiv. In den 14 Proben vom Menschen aus Nordamerika war das *drhm* Gen nicht nachweisbar. Ebenfalls *drhm* negativ waren je ein Stamm vom Hund, vom Streifen-Backenhörnchen und von der Wiesenhüpfmaus. Ein Isolat vom Pferd und 3 Isolate aus *I. scapularis* Zecken dagegen besaßen das *drhm* Gen.

Tabelle 14: *drhm* und APH_0919/APH_0922 Status der 114 *A. phagocytophilum* positiven Proben, 42 weiterer Stämme vom Menschen und von 11 Datensätzen aus der GenBank

Probenname	Wirt (Trivialname)	Wirt (Zoologisch)	Region	<i>drhm</i>	APH-Locus ¹
cat_596400	Katze	<i>F. catus</i>	Europa	pos	pos
cat_971	Katze	<i>F. catus</i>	Europa	pos	pos
cow_14_0406	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
cow_22_0907	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
cow_22_1610	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
cow_22_3005	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
cow_28_0310	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
cow_30_0406	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
cow_30_1705	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
cow_30_2506	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
cow_35_1705	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
cow_36_1905	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
cow_46_2205	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
cow_46_2506	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
cow_49_1905	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
cow_52_1809	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
cow_53_2506	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
cow_57_0406	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
cow_58_1705	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
cow_59_0409	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
cow_61_2206	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
cow_7_2506	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
cow_A287	Rind	<i>B. taurus</i>	Europa	pos	pos
dog_126418	Hund	<i>C. l. familiaris</i>	Europa	pos	pos
dog_555277	Hund	<i>C. l. familiaris</i>	Europa	pos	pos
dog_594819	Hund	<i>C. l. familiaris</i>	Europa	pos	pos
dog_597576	Hund	<i>C. l. familiaris</i>	Europa	pos	pos
dog_601717	Hund	<i>C. l. familiaris</i>	Europa	pos	pos
dog_602430	Hund	<i>C. l. familiaris</i>	Europa	pos	pos

Probenname	Wirt (Trivialname)	Wirt (Zoologisch)	Region	drhm	APH-Locus ¹
dog_602741	Hund	<i>C. l. familiaris</i>	Europa	pos	pos
dog_660279	Hund	<i>C. l. familiaris</i>	Europa	pos	pos
dog_723471	Hund	<i>C. l. familiaris</i>	Europa	pos	pos
dog_747278	Hund	<i>C. l. familiaris</i>	Europa	pos	pos
dog_752482	Hund	<i>C. l. familiaris</i>	Europa	neg	pos
dog_Nico S36457_13	Hund	<i>C. l. familiaris</i>	Europa	pos	pos
dog_rosa isolate	Hund	<i>C. l. familiaris</i>	Europa	neg	pos
fallow_deer_1	Damhirsch	<i>D. d. dama</i>	Europa	pos	pos
fallow_deer_3	Damhirsch	<i>D. d. dama</i>	Europa	pos	pos
fallow_deer_7	Damhirsch	<i>D. d. dama</i>	Europa	pos	pos
fallow_deer_8	Damhirsch	<i>D. d. dama</i>	Europa	pos	pos
goat_31298	Ziege	<i>C. a. hircus</i>	Europa	pos	pos
goat_A8July	Ziege	<i>C. a. hircus</i>	Europa	pos	pos
goat_B10June	Ziege	<i>C. a. hircus</i>	Europa	pos	pos
goat_B11June	Ziege	<i>C. a. hircus</i>	Europa	pos	pos
goat_M8October	Ziege	<i>C. a. hircus</i>	Europa	pos	pos
horse_11523712	Pferd	<i>E. caballus</i>	Europa	pos	pos
horse_11527691	Pferd	<i>E. caballus</i>	Europa	pos	pos
horse_1187640	Pferd	<i>E. caballus</i>	Europa	pos	pos
horse_689227	Pferd	<i>E. caballus</i>	Europa	pos	pos
horse_S1025_09	Pferd	<i>E. caballus</i>	Europa	pos	pos
horse_S1071_08	Pferd	<i>E. caballus</i>	Europa	pos	pos
horse_S1074_09	Pferd	<i>E. caballus</i>	Europa	pos	pos
horse_S1085_09	Pferd	<i>E. caballus</i>	Europa	pos	pos
horse_S1201_05	Pferd	<i>E. caballus</i>	Europa	pos	pos
horse_S1220_08	Pferd	<i>E. caballus</i>	Europa	pos	pos
horse_S1379_06	Pferd	<i>E. caballus</i>	Europa	pos	pos
horse_S1523_07	Pferd	<i>E. caballus</i>	Europa	pos	pos
horse_S1729_08	Pferd	<i>E. caballus</i>	Europa	pos	pos
horse_S1741_07	Pferd	<i>E. caballus</i>	Europa	pos	pos

Probenname	Wirt (Trivialname)	Wirt (Zoologisch)	Region	drhm	APH-Locus¹
horse_S1829_04	Pferd	<i>E. caballus</i>	Europa	pos	pos
horse_S2614_07	Pferd	<i>E. caballus</i>	Europa	pos	Pos
horse_S2630_07	Pferd	<i>E. caballus</i>	Europa	pos	pos
horse_S654_04	Pferd	<i>E. caballus</i>	Europa	pos	pos
human_10015	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_10377	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_1148	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_11946	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_1566	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_1567	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_1680	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_2118	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_3027	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_3537	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_451	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_4598	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_472	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_4950	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_6219	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_6460	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_6468	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_6725	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_7557	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_8544	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_8569	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_9519	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_9896	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_D1153	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_D1305	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_D1552	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_D2218	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_D227	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos

Probenname	Wirt (Trivialname)	Wirt (Zoologisch)	Region	drhm	APH-Locus ¹
human_D2384	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_D2475	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_D2482	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_D2591	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_D3259	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_D77	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
human_Slovenia	Mensch	<i>H. sapiens</i>	Europa	pos	pos
ibex_5	Steinbock	<i>C. ibex</i>	Europa	pos	pos
ibex_6	Steinbock	<i>C. ibex</i>	Europa	pos	pos
mouflon_3	Europäischer Mufflon	<i>O. g. musimon</i>	Europa	pos	pos
mouflon_4	Europäischer Mufflon	<i>O. g. musimon</i>	Europa	pos	pos
mouflon_7	Europäischer Mufflon	<i>O. g. musimon</i>	Europa	pos	pos
mouflon_10	Europäischer Mufflon	<i>O. g. musimon</i>	Europa	pos	pos
red_deer_M19	Rothirsch	<i>C. elaphus</i>	Europa	pos	pos
red_deer_M22	Rothirsch	<i>C. elaphus</i>	Europa	pos	pos
red_deer_M23	Rothirsch	<i>C. elaphus</i>	Europa	pos	pos
red_deer_M5	Rothirsch	<i>C. elaphus</i>	Europa	pos	pos
red_deer_M6	Rothirsch	<i>C. elaphus</i>	Europa	neg	pos
red_deer_M8	Rothirsch	<i>C. elaphus</i>	Europa	pos	pos
red_deer_M9	Rothirsch	<i>C. elaphus</i>	Europa	pos	pos
red_deer_Ro1	Rothirsch	<i>C. elaphus</i>	Europa	pos	pos
red_deer_Ro14	Rothirsch	<i>C. elaphus</i>	Europa	pos	pos
red_deer_Ro15	Rothirsch	<i>C. elaphus</i>	Europa	pos	pos
red_deer_Ro18	Rothirsch	<i>C. elaphus</i>	Europa	pos	pos
red_deer_Ro1P	Rothirsch	<i>C. elaphus</i>	Europa	pos	pos
red_deer_Ro2	Rothirsch	<i>C. elaphus</i>	Europa	pos	pos
red_deer_Ro3	Rothirsch	<i>C. elaphus</i>	Europa	pos	pos
red_deer_Ro4	Rothirsch	<i>C. elaphus</i>	Europa	pos	pos

Probenname	Wirt (Trivialname)	Wirt (Zoologisch)	Region	drhm	APH-Locus ¹
red_deer_Ro5	Rothirsch	<i>C. elaphus</i>	Europa	pos	pos
red_deer_Ro6	Rothirsch	<i>C. elaphus</i>	Europa	pos	pos
red_deer_Ro9	Rothirsch	<i>C. elaphus</i>	Europa	pos	pos
red_fox_0079	Rotfuchs	<i>V. vulpes</i>	Europa	pos	pos
red_fox_0115	Rotfuchs	<i>V. vulpes</i>	Europa	pos	pos
roe_deer_0185	Reh	<i>C. capreolus</i>	Europa	pos	pos
roe_deer_0359	Reh	<i>C. capreolus</i>	Europa	pos	pos
roe_deer_0568	Reh	<i>C. capreolus</i>	Europa	pos	pos
roe_deer_0571	Reh	<i>C. capreolus</i>	Europa	pos	pos
roe_deer_457	Reh	<i>C. capreolus</i>	Europa	pos	pos
roe_deer_510	Reh	<i>C. capreolus</i>	Europa	pos	pos
roe_deer_546	Reh	<i>C. capreolus</i>	Europa	pos	pos
sika_deer_11	Sikahirsch	<i>C. nippon</i>	Europa	pos	pos
sika_deer_12	Sikahirsch	<i>C. nippon</i>	Europa	pos	pos
sika_deer_17	Sikahirsch	<i>C. nippon</i>	Europa	pos	pos
sika_deer_3	Sikahirsch	<i>C. nippon</i>	Europa	pos	pos
sika_deer_5	Sikahirsch	<i>C. nippon</i>	Europa	pos	pos
sika_deer_7	Sikahirsch	<i>C. nippon</i>	Europa	pos	pos
sika_deer_9	Sikahirsch	<i>C. nippon</i>	Europa	pos	pos
tick_CM20	Gemeiner Holzbock (Amsel)	<i>I. ricinus</i> (<i>T. merula</i>)	Europa	neg	neg
tick_CS2	Gemeiner Holzbock (Amsel)	<i>I. ricinus</i> (<i>T. merula</i>)	Europa	neg	neg
tick_CS3	- (Amsel)	<i>I. frontalis</i> (<i>T. merula</i>)	Europa	pos	pos
wild_boar_0242	Wildschwein	<i>S. scrofa</i>	Europa	pos	pos
wild_boar_0254	Wildschwein	<i>S. scrofa</i>	Europa	pos	pos
wild_boar_0261	Wildschwein	<i>S. scrofa</i>	Europa	pos	pos
wild_boar_0351	Wildschwein	<i>S. scrofa</i>	Europa	pos	pos
wild_boar_0361	Wildschwein	<i>S. scrofa</i>	Europa	pos	pos

Probenname	Wirt (Trivialname)	Wirt (Zoologisch)	Region	drhm	APH-Locus ¹
chipmunk_ CR1007 ²	Streifen- Backen- hörnchen	<i>T. striatus</i>	USA	neg	pos
dog_MIS ²	Hund	<i>C. l. familiaris</i>	USA	neg	pos
horse_MRK ²	Pferd	<i>E. caballus</i>	USA	pos	pos
human_96HE27	Mensch	<i>H. sapiens</i>	USA	neg	pos
human_96HE54	Mensch	<i>H. sapiens</i>	USA	neg	pos
human_96HE58	Mensch	<i>H. sapiens</i>	USA	neg	pos
human_97HE97	Mensch	<i>H. sapiens</i>	USA	neg	pos
human_98HE4	Mensch	<i>H. sapiens</i>	USA	neg	pos
human_99HE4	Mensch	<i>H. sapiens</i>	USA	neg	pos
human_ApNYW ²	Mensch	<i>H. sapiens</i>	USA	neg	pos
human_ApWI1 ²	Mensch	<i>H. sapiens</i>	USA	neg	pos
human_HGE1	Mensch	<i>H. sapiens</i>	USA	neg	pos
human_HGE2 ²	Mensch	<i>H. sapiens</i>	USA	neg	pos
human_HZ	Mensch	<i>H. sapiens</i>	USA	neg	pos
human_NCH-1 ²	Mensch	<i>H. sapiens</i>	USA	neg	pos
human_O3HE	Mensch	<i>H. sapiens</i>	USA	neg	pos
human_Webster	Mensch	<i>H. sapiens</i>	USA	neg	pos
rodent_JM ²	Wiesen- hüpfmaus	<i>Z. hudsonius</i>	USA	neg	pos
tick_CRT35 ²	Hirschzecke	<i>I. scapularis</i>	USA	pos	pos
tick_CRT38 ²	Hirschzecke	<i>I. scapularis</i>	USA	pos	pos
tick_CRT53-1 ²	Hirschzecke	<i>I. scapularis</i>	USA	pos	pos

¹APH_0919/APH_0922; ²Ergebnisse aus der GenBank

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnten für 114 *A. phagocytophilum* positive Proben vollständige Profile für MLST und *ankA* bestimmt werden. In 26 Proben wurden uneindeutige Basen in mindestens einem Haushaltsgen gefunden (Tabelle 11). Dieser Beobachtung liegt sehr wahrscheinlich eine Infektion mit verschiedenen *A. phagocytophilum* Stämmen zugrunde. Ähnliche Mehrfachinfektionen wurden bei Hunden [100, 136], Rindern [60, 62, 116, 137], Schafen [100, 138], Rehen [100, 116, 139, 140] und Hirschen [62, 141] beobachtet. In der vorliegenden Arbeit stammten 96% (25/26) der Proben, in denen MLST-basiert mehrere *A. phagocytophilum* Stämme nachgewiesen wurden, von Wildwiederkäuern (Tabelle 12). Wahrscheinlich spiegelt dies die andauernde Zecken-Exposition dieser Wirte wieder. Da auch mehrfach infizierte *I. ricinus* Zecken gefunden wurden [101, 140], besteht die Möglichkeit einer Ko-Transmission verschiedener Varianten. Es kann sich jedoch auch um Superinfektionen handeln, deren Vorkommen unter natürlichen Bedingungen für Rinder [59, 137] und unter experimentellen Konditionen für Schafe [142] gezeigt wurde.

Für die Allel-basierte MLST-Analyse betrug die Typisierbarkeit aufgrund der Mehrfachinfektionen 77%. Eine ähnliche eingeschränkte Typisierbarkeit wurde schon früher berichtet und lag bei 66% [132] bzw. 74% [62].

Neben dem Nachweis von uneindeutigen Basen in den Chromatogrammen der Haushaltsgene wurden auch Doppel- und Dreifachinfektionen mit *A. phagocytophilum* Stämmen gefunden, die zu verschiedenen *ankA* Clustern gehörten. Dies betraf 3 Rothirsche und einen Sikahirsch. Ähnliches wurde für Rehe [62, 139], Rothirsche [62], *I. ricinus* Zecken [62], aber auch für Nutztiere wie Rinder [58, 60] in der Vergangenheit berichtet und dürfte durch Ko- oder Superinfektionen mit unterschiedlichen Varianten bedingt sein.

Als Reservoirwirte für die humane Infektion wurden in Europa Rehe (*Capreolus capreolus*), Rothirsche (*Cervus elaphus*), Wildschweine (*Sus scrofa*), Igel (*Erinaceus europaeus*) und verschiedene Nagetiere diskutiert [62, 76, 79]. In dieser Arbeit wurden bei Hunden, Pferden, einer Katze, bei Wildschweinen und Rotfüchsen dieselben ST wie beim Menschen (ST 25 und ST 54) gefunden (Tabelle 11), was dafür sprechen könnte, dass Wildschweine als Reservoir für humanpathogene Varianten von *A. phagocytophilum* dienen. Dies wurde auch aufgrund einer *groESL*- und *ankA*-basierten Typisierung vermutet [143, 144]. Ähnlich wie in dieser Arbeit

wurden *A. phagocytophilum* Stämme von Rotfüchsen dem *groEL* Ökotyp I zugeordnet, der auch die Stämme vom Menschen enthielt [106]. Daher könnten auch Rotfüchse als Reservoirwirte für die humane Infektion in Frage kommen. Bislang wurden allerdings nur sehr wenige Proben von Rotfüchsen untersucht.

47% (8/17) der Proben von Sikahirschen, Damhirschen, Mufflons und Steinböcken, die hier erstmalig mittels MLST untersucht wurden, waren aufgrund von Ambiguitäten in den Chromatogrammen nicht typisierbar (Tabelle 11), darunter alle Proben von Mufflons. Die Proben, denen ein ST zugeordnet werden konnte, zeigten in keinem Fall einen beim Menschen gefundenen ST und verteilten sich über die *ankA* Cluster 1, 2, 3 und 4 (Tabelle 11). Da *A. phagocytophilum* Stämme vom Menschen bislang ausschließlich im *ankA* Cluster 1 gefunden wurden [62], kommen Sikahirsche, Damhirsche und Steinböcke eher nicht als Reservoir für humanpathogene Stämme in Frage.

Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben von Rehen gehörten zum MLST und *ankA* Cluster 2. Die bisher charakterisierten Stämme von Rehen waren Teil des MLST Clusters 2 und der *ankA* Cluster 2, 3 und 4 [62]. Der MLST Cluster 2 war zudem als Reh-spezifisch angesehen worden, da er mit Ausnahme von einer Probe vom Rothirsch nur Stämme von Rehen und *I. ricinus* Zecken enthielt [62]. Hier wurden erstmalig auch eine Probe vom Rind und 3 Proben von Ziegen dem MLST Cluster 2 zugeordnet (Tabelle 11). Interessanterweise zeigten alle 4 Tiere keine klinischen Krankheitszeichen [59, 145], so dass Stämme des MLST Clusters 2 möglicherweise weniger pathogen für Nutztiere sind. Andererseits wurden im Rahmen einer Multilocus-Sequenz-Analyse vereinzelte *A. phagocytophilum* Stämme von klinisch erkrankten Rindern in einem Reh-assoziierten Cluster gefunden [116]. Da jedoch die Mehrheit der bovinen Proben zu zwei anderen Clustern gehörte, wird angenommen, dass Rehe keine relevanten Reservoirwirte für die granulozytäre Anaplasiose der Rinder sind.

MLST Cluster 7 und *ankA* Cluster 6 wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig als Vogel-assoziiert beschrieben. Beide Cluster waren in der phylogenetischen Analyse deutlich von allen anderen übrigen Clustern separiert (Abbildungen 10, 11, 12 und 13). Hierbei stammten 2 der 3 Proben nicht direkt von einem Vogel, sondern von *I. ricinus* Zecken, die an Amseln gesaugt hatten. Da die Herkunft der Blutmahlzeit nicht analysiert wurde, könnte diese formal auch von einem anderen Wirt stammen. Die entsprechenden Haushaltsgen- und *ankA* Sequenzen wurden jedoch bislang bei keiner anderen Spezies gefunden. Daher scheint eine Assoziation von MLST Cluster

7 und *ankA* Cluster 6 mit Vögeln wahrscheinlich. Bislang wurden allerdings nur sehr wenige *A. phagocytophilum* Stämme von Vögeln charakterisiert. Auch aufgrund einer *groEL*-basierten Typisierung wurden ein Vogel-assoziiertes *groEL* Ökotyp IV [106] bzw. ein *groEL* Cluster 7 [107] beschrieben.

Ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit neu beschrieben wurde *ankA* Cluster 7. Die Sequenz der entsprechenden Pferdeprobe horse_S1523_07 war in ihrem ersten Teil zu Cluster 1 Sequenzen und in ihrem zweiten Teil zu Cluster 4 Sequenzen homolog. Dies spricht dafür, dass Sequenzen des Clusters 7 durch Rekombination aus Cluster 1 und Cluster 4 Sequenzen entstanden sind. Bereits früher wurde vermutet, dass das *ankA* Gen der homologen Rekombination unterliegt [117]. Doppelinfektionen eines Wirts mit verschiedenen *ankA* Varianten als Voraussetzung solcher Ereignisse kommen wie oben beschrieben regelmäßig vor.

Bislang wurden *A. phagocytophilum* Stämme vom Pferd nur in *ankA* Cluster 1 gefunden [62]. Erstmals im Rahmen dieser Arbeit wurde eine zu *ankA* Cluster 4 gehörige Sequenz beim Pferd nachgewiesen (horse_11527691), was zusätzlich dafürspricht, dass *ankA* Cluster 7 Sequenzen durch Infektion von Pferden mit Cluster 1 und Cluster 4 Varianten entstehen. Da durch ein einziges Rekombinationsereignis sehr viele Austausch gleichzeitig eingeführt werden können, verzerren diese das phylogenetische Signal [119]. Die Aussagekraft der *ankA*-basierten Typisierung ist daher möglicherweise eingeschränkt.

Der MLST Cluster 1 enthielt als einziger Cluster Proben aus Europa und Nordamerika. Die US-amerikanischen *A. phagocytophilum* Stämme des Clusters 1 wurden jedoch durch eine von einem hohen Bootstrapwert von 99% gestützte Verzweigung von den Sequenzen aus Europa abgegrenzt (Abbildung 11). Darüber hinaus gehörten 3 Isolate aus nordamerikanischen *I. scapularis* Zecken zu einem eigenen, hier neu beschriebenen MLST Cluster 8 (Abbildung 11). Dies zeigt, dass die MLST-Analyse geographisches Auflösungsvermögen hinsichtlich des Kontinents besitzt. Eine ähnliche Beobachtung wurde für die *ankA*-basierte Typisierung gemacht, da die *A. phagocytophilum* Stämme aus den USA ausschließlich in den *ankA* Clustern 11 und 12 gefunden wurden (Abbildung 13).

Die 3 Isolate von *I. scapularis*, die als nicht-humanpathogene Ap-V1 Varianten beschrieben wurden [134], gehörten im Gegensatz zu den Stämmen vom Menschen zum MLST Cluster 8 (Abbildung 11). Andererseits beinhaltete der *ankA* Cluster 12 sowohl Proben vom Menschen als auch die genannten *I. scapularis* Zecken

(Abbildung 13). Daher erscheint es fraglich, ob die Einteilung in nicht-humanpathogene Ap-V1 und humanpathogene Ap-ha Varianten tatsächlich valide ist, zumal sie auf einem Austausch von nur 2 Basen im 16S rRNA Gen beruht [146].

Für Europa wurde eine enge Verwandtschaft von *A. phagocytophilum* Stämmen von Menschen, Hunden und Pferden basierend auf der Analyse des *groESL* [147] und *ankA* [100] Gens sowie der MLST [62] gezeigt. Dies entspricht den Ergebnissen dieser Arbeit, da die beim Menschen gefundenen ST 25 und ST 54 auch bei Hunden und Pferden nachweisbar waren (Tabelle 11). Für die USA wurde ein Clustering der *msp2* Sequenzen von Menschen, Hunden und Pferden gezeigt [108]. Die Ähnlichkeit humaner Stämme mit denen vom Hund und Pferd wird weiterhin durch Kreuzinfektionsversuche gestützt. Sowohl Hunde [93] als auch Pferde [90, 91, 97] waren für eine Infektion mit einem humanen *A. phagocytophilum* Isolat empfänglich.

Im Gegensatz zu den USA wird die HGA in Europa selten diagnostiziert [127]. Symptomatische *A. phagocytophilum* Infektionen bei Hunden [4] und Pferden [5] sind in Europa jedoch gut dokumentiert. Dies gilt auch für Deutschland [51-56], obwohl bislang keine gesicherte humane Erkrankung bekannt ist. Aufgrund der Homologie der *A. phagocytophilum* Stämme von Menschen, Hunden und Pferden, dürfte es jedoch wahrscheinlich sein, dass die HGA in Deutschland unterdiagnostiziert ist.

Die Deletion des *drhm* Gens wurde als Marker zur Identifikation humanpathogener *A. phagocytophilum* Stämme vorgeschlagen [125]. Die 8 bislang untersuchten nordamerikanischen Stämme vom Menschen waren *drhm* negativ [125]. Daten für Europa lagen nicht vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere humane Stämme aus den USA analysiert, die das *drhm* Gen ebenfalls nicht besaßen (Tabelle 14). Alle 35 Proben vom Menschen aus Europa waren jedoch *drhm* positiv. Daher scheint die Deletion des *drhm* Gens nicht grundsätzlich ein Marker für Humanpathogenität zu sein. Angesichts der beschriebenen epidemiologischen Unterschiede in der Inzidenz der HGA zwischen den USA und Europa, könnte es jedoch sein, dass die *drhm* positiven europäischen Stämme weniger virulent sind als die nordamerikanischen. Eine weitere Studie an *A. phagocytophilum* Stämmen aus den USA zeigte, dass 20% (4/20) der Proben vom Hund und 53% (11/21) der Proben vom Pferd *drhm* positiv waren [126]. Eine Korrelation mit der Wirtspezies wurde nicht gefunden. Im Rahmen dieser Arbeit waren europäische Stämme vom Hund (11/13) und vom Pferd (18/18) ebenfalls mehrheitlich *drhm* positiv (Tabelle 14). Daher scheint der *drhm* Status des *A. phagocytophilum* Stammes auch bei diesen Wirten nicht mit der Pathogenität assoziiert zu sein.

Insgesamt war der Anteil der analysierten Proben aus den USA wesentlich kleiner als der aus Europa und stammte von einem begrenzteren Wirtsspektrum. Daher sollten die Ergebnisse dieser Arbeit unter Einbeziehung weiterer Stämme aus Nordamerika verifiziert werden.

5 Zusammenfassung

Anaplasma phagocytophilum ist ein obligat intrazelluläres, Gram-negatives Bakterium, das in neutrophilen Granulozyten seines Wirts repliziert und durch Zecken des *Ixodes ricinus* Komplex übertragen wird. Es ruft fieberhafte Erkrankungen beim Menschen sowie bei Haus- und Nutztieren hervor. Im Gegensatz zu den USA wird die humane granulozytäre Anaplasiose in Europa selten diagnostiziert. Die Deletion des *drhm* Gens wurde in nordamerikanischen *A. phagocytophilum* Stämmen untersucht und als Marker für Humanpathogenität vorgeschlagen. Für Europa lagen diesbezüglich keine Daten vor. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit 146 europäische und 21 nordamerikanische *A. phagocytophilum* Stämme von verschiedenen Wirtsspezies auf das Vorhandensein des *drhm* Gens untersucht. Zum Vergleich wurde die Charakterisierung mittels Multilocus Sequence Typing (MLST) und *ankA*-basierter Typisierung herangezogen. Im Gegensatz zu den USA waren alle 35 *A. phagocytophilum* Stämme von Menschen aus Europa *drhm* positiv. Daher scheint das Vorhandensein des *drhm* Gens nicht grundsätzlich mit fehlender Humanpathogenität assoziiert zu sein. Europäische und nordamerikanische humane Stämme wurden beide im MLST Cluster 1 gefunden, so dass sie homolog zu sein scheinen. Weiterhin waren *A. phagocytophilum* Stämme von Hunden und Pferden aus Europa denen des Menschen bezüglich *drhm* Genstatus, MLST und *ankA* Cluster sehr ähnlich. Da die granulozytäre Anaplasiose bei diesen Tieren in Europa regelmäßig diagnostiziert wird, erscheint es wahrscheinlich, dass die entsprechende Erkrankung des Menschen nicht erkannt wird. Keines der angewandten Typisierungsverfahren war geeignet, die unterschiedliche Epidemiologie zwischen Nordamerika und Europa hinreichend zu erklären. Die Deletion des *drhm* Gens war nicht mit Humanpathogenität assoziiert.

6 Literaturverzeichnis

1. **Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, et al.** Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;**51**:2145-65.
2. **Ismail N, Bloch KC, McBride JW.** Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clin Lab Med.* 2010;**30**:261-92.
3. **Stuen S, Granquist EG, Silaghi C.** *Anaplasma phagocytophilum*-a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;**3**:31.
4. **Carrade DD, Foley JE, Borjesson DL, Sykes JE.** Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *J Vet Intern Med.* 2009;**23**:1129-41.
5. **Saleem S, Ijaz M, Farooqi SH, Ghaffar A, Ali A, Iqbal K, et al.** Equine Granulocytic Anaplasmosis 28 years later. *Microb Pathog.* 2018;**119**:1-8.
6. **Lappin MR.** Update on flea and tick associated diseases of cats. *Vet Parasitol.* 2018;**254**:26-9.
7. **Atif FA.** *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: *Rickettsiales* pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitol Res.* 2015;**114**:3941-57.
8. **Gordon WS, Brownlee A, Wilson DR, MacLeod J.** Tick-borne fever (a hitherto undescribed disease of sheep). *J Comp Pathol.* 1932;**45**:301-12.
9. **Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH.** Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol.* 1994;**32**:589-95.
10. **Petrovec M, Lotrič-Furlan S, Avsic Zupanc T, Strle F, Brouqui P, Roux V, et al.** Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *J Clin Microbiol.* 1997;**35**:1556-9.
11. **Lotrič-Furlan S, Petrovec M, Avsic Zupanc T, Nicholson WL, Sumner JW, Childs JE, et al.** Human granulocytic ehrlichiosis in Europe: clinical and laboratory findings in four patients from Slovenia. *Clin Infect Dis.* 1998;**27**:424-8.

12. **Rar V, Golovljova I.** *Anaplasma, Ehrlichia, and "Candidatus Neoehrlichia" bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review.* Infect Genet Evol. 2011;**11**:1842-61.
13. **Kocan KM, de la Fuente J, Cabezas-Cruz A.** The genus *Anaplasma*: new challenges after reclassification. Rev Sci Tech. 2015;**34**:577-86.
14. **Blanco JR, Oteo JA.** Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. Clin Microbiol Infect. 2002;**8**:763-72.
15. **Strle F.** Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. Int J Med Microbiol. 2004;**293 S37**:27-35.
16. **Xu B, Liu L, Hunang X, Ma H, Zhang Y, Du Y, et al.** Metagenomic analysis of fever, thrombocytopenia and leukopenia syndrome (FTLS) in Henan Province, China: discovery of a new bunyavirus. PLoS Pathog. 2011;**7**:e1002369.
17. **Zhang L, Wang G, Liu Q, Chen C, Li J, Long B, et al.** Molecular analysis of *Anaplasma phagocytophilum* isolated from patients with febrile diseases of unknown origin. PLoS One. 2013;**8**:e57155.
18. **Ohashi N, Gaowa, Wuritu, Kawamori F, Wu D, Yoshikawa Y, et al.** Human granulocytic anaplasmosis, Japan. Emerg Infect Dis. 2013;**19**:289-92.
19. **Kim KH, Yi J, Oh WS, Kim NH, Choi SJ, Choe PG, et al.** Human granulocytic anaplasmosis, South Korea, 2013. Emerg Infect Dis. 2014;**20**:1708-11.
20. **Tsai KH, Chung LH, Chien CH, Tung YJ, Wei HY, Yen TY, et al.** Human granulocytic anaplasmosis in Kinmen, an offshore island of Taiwan. PLoS Negl Trop Dis. 2019;**13**:e0007728.
21. **Cochez C, Ducoffre G, Vandenvelde C, Luyasu V, Heyman P.** Human anaplasmosis in Belgium: a 10-year seroepidemiological study. Ticks Tick Borne Dis. 2011;**2**:156-9.
22. **Hing M, Woestyn S, Van Bosterhaut B, Desbonnet Y, Heyman P, Cochez C, et al.** Diagnosis of human granulocytic anaplasmosis in Belgium by combining molecular and serological methods. New Microbes New Infect. 2014;**2**:177-8.
23. **Hing M, Van Den Bossche D, Lernout T, Cochez C, Pirnay JP, Heuninckx W.** Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in humans in Belgium for the period 2013-2016. Acta Clin Belg. 2019;**74**:280-5.

24. **Remy V, Hansmann Y, de Martino S, Christmann D, Brouqui P.** Human anaplasmosis presenting as atypical pneumonitis in France. *Clin Infect Dis.* 2003;**37**:846-8.
25. **Koebel C, Kern A, Edouard S, Hoang AT, Celestin N, Hansmann Y, et al.** Human granulocytic anaplasmosis in eastern France: clinical presentation and laboratory diagnosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;**72**:214-8.
26. **Edouard S, Koebel C, Goehringer F, Socolovschi C, Jaulhac B, Raoult D, et al.** Emergence of human granulocytic anaplasmosis in France. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012;**3**:403-5.
27. **Hansmann Y, Jaulhac B, Kieffer P, Martinot M, Wurtz E, Dukic R, et al.** Value of PCR, serology, and blood Smears for human granulocytic anaplasmosis diagnosis, France. *Emerg Infect Dis.* 2019;**25**:996-8.
28. **van Dobbenburgh A, Dam AP, Fikrig E.** Human granulocytic ehrlichiosis in western Europe. *N Engl J Med.* 1999;**340**:1214-6.
29. **Walder G, Falkensammer B, Aigner J, Tiwald G, Dierich MP, Würzner R, et al.** First documented case of human granulocytic ehrlichiosis in Austria. *Wien Klin Wochenschr.* 2003;**115**:263-6.
30. **Lagler H, Harrison N, Kussmann M, Obermuller M, Burgmann H, Makristathis A, et al.** Direct detection of *Anaplasma phagocytophilum* by polymerase chain reaction followed by electrospray ionization mass spectrometry from human blood. *Int J Infect Dis.* 2017;**60**:61-3.
31. **Grzeszczuk A, Ziarko S, Kovalchuk O, Stańczyk J.** Etiology of tick-borne febrile illnesses in adult residents of North-Eastern Poland: report from a prospective clinical study. *Int J Med Microbiol.* 2006;**296 Suppl 40**:242-9.
32. **Dunaj J, Moniuszko-Malinowska A, Swiecicka I, Andersson M, Czupryna P, Rutkowski K, et al.** Tick-borne infections and co-infections in patients with non-specific symptoms in Poland. *Adv Med Sci.* 2018;**63**:167-72.
33. **Karlsson U, Bjöersdorff A, Massung RF, Christensson B.** Human granulocytic ehrlichiosis - a clinical case in Scandinavia. *Scand J Infect Dis.* 2001;**33**:73-4.
34. **Bjöersdorff A, Wittesjö B, Berglund J, Massung RF, Eliasson I.** Human granulocytic ehrlichiosis as a common cause of tick-associated fever in southeast Sweden: report from a prospective clinical study. *Scand J Infect Dis.* 2002;**34**:187-91.

35. **Laferl H, Hogrefe W, Kock T, Pichler H.** A further case of acute human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999;**18**:385-6.
36. **Lotrič-Furlan S, Petrovec M, Avsič-Županc T, Strle F.** Comparison of patients fulfilling criteria for confirmed and probable human granulocytic ehrlichiosis. *Scand J Infect Dis.* 2004;**36**:817-22.
37. **Lotrič-Furlan S, Rojko T, Petrovec M, Avsič-Županc T, Strle F.** Epidemiological, clinical and laboratory characteristics of patients with human granulocytic anaplasmosis in Slovenia. *Wien Klin Wochenschr.* 2006;**118**:708-13.
38. **Lotrič-Furlan S, Rojko T, Jelovšek M, Petrovec M, Avsič-Županc T, Lusa L, et al.** Comparison of clinical and laboratory characteristics of patients fulfilling criteria for proven and probable human granulocytic anaplasmosis. *Microbes Infect.* 2015;**17**:829-33.
39. **Lotrič-Furlan S, Petrovec M, Avsič-Županc T, Nicholson WL, Sumner JW, Childs JE, et al.** Prospective assessment of the etiology of acute febrile illness after a tick bite in Slovenia. *Clin Infect Dis.* 2001;**33**:503-10.
40. **García JC, Núñez MJ, Castro B, Fraile FJ, López A, Mella MC, et al.** Human anaplasmosis: the first Spanish case confirmed by PCR. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;**1078**:545-7.
41. **Pusterla N, Huder JB, Lutz H, Braun U.** Detection of *Ehrlichia phagocytophila* DNA in *Ixodes ricinus* ticks from areas in Switzerland where tick-borne fever is endemic. *J Clin Microbiol.* 1998;**36**:2735-6.
42. **Petrovec M, Sumner JW, Nicholson WL, Childs JE, Strle F, Barlic J, et al.** Identity of ehrlichial DNA sequences derived from *Ixodes ricinus* ticks with those obtained from patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. *J Clin Microbiol.* 1999;**37**:209-10.
43. **von Stedingk LV, Gürtelschmid M, Hanson HS, Gustafson R, Dotevall L, Olsson E, E., et al.** The human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent in Swedish ticks. *Clin Microbiol Infect.* 1997;**3**:573-4.
44. **Cinco M, Padovan D, Murgia R, Maroli M, Frusteri L, Heldtander M, et al.** Coexistence of *Ehrlichia phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Italy as determined by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol.* 1997;**35**:3365-6.

45. **Dumler JS, Choi K-S, Garcia-Garcia JC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, et al.** Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg Infect Dis*. 2005;**11**:1828-34.
46. **Wang F, Yan M, Liu A, Chen T, Luo L, Li L, et al.** The seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in global human populations: A systematic review and meta-analysis. *Transbound Emerg Dis*. 2020;n/a.
47. **Fingerle V, Goodman JL, Johnson RC, Kurtti TJ, Munderloh UG, Wilske B.** Human granulocytic ehrlichiosis in southern Germany: increased seroprevalence in high-risk groups. *J Clin Microbiol*. 1997;**35**:3244-7.
48. **Hunfeld K-P, Brade V.** Prevalence of antibodies against the human granulocytic ehrlichiosis agent in Lyme borreliosis patients from Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999;**18**:221-4.
49. **Kowalski J, Hopfenmüller W, Fingerle V, Malberg H, Eisenblätter M, Wagner J, et al.** Seroprevalence of human granulocytic anaplasmosis in Berlin/Brandenburg, Germany: an 8-year survey. *Clin Microbiol Infect*. 2006;**12**:924-7.
50. **Woessner R, Gaertner BC, Grauer MT, Weber K, Mueller-Lantsch N, Hunfeld KP, et al.** Incidence and prevalence of infection with human granulocytic ehrlichiosis agent in Germany. A prospective study in young healthy subjects. *Infection*. 2001;**29**:271-3.
51. **von Loewenich FD, Stumpf G, Baumgarten BU, Röllinghoff M, Dumler JS, Bogdan C.** A case of equine granulocytic ehrlichiosis provides molecular evidence for the presence of pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* (HGE Agent) in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003;**22**:303-5.
52. **Silaghi C, Liebisch G, Pfister K.** Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases. *Parasit Vectors*. 2011;**4**:161.
53. **Jensen J, Simon D, Murua Escobar H, Soller JT, Bullerdiek J, Beelitz P, et al.** *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Zoonoses Public Health*. 2007;**54**:94-101.
54. **Kohn B, Galke D, Beelitz P, Pfister K.** Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *J Vet Intern Med*. 2008;**22**:1289-95.
55. **Kohn B, Silaghi C, Galke D, Arndt G, Pfister K.** Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Res Vet Sci*. 2011;**91**:71-6.

56. **Chirek A, Silaghi C, Pfister K, Kohn B.** Granulocytic anaplasmosis in 63 dogs: clinical signs, laboratory results, therapy and course of disease. *J Small Anim Pract.* 2018;**59**:112-20.
57. **Nieder M, Silaghi C, Hamel D, Pfister K, Schmäschke R, Pfeffer M.** Tick-borne fever caused by *Anaplasma phagocytophilum* in Germany: first laboratory confirmed case in a dairy cattle herd. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere.* 2012;**40**:101-6.
58. **Henniger T, Henniger P, Grossmann T, Distl O, Ganter M, von Loewenich FD.** Congenital infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a calf in northern Germany. *Acta Vet Scand.* 2013;**55**:38.
59. **Silaghi C, Nieder M, Sauter-Louis C, Knubben-Schweizer G, Pfister K, Pfeffer M.** Epidemiology, genetic variants and clinical course of natural infections with *Anaplasma phagocytophilum* in a dairy cattle herd. *Parasit Vectors.* 2018;**11**:20.
60. **Tegtmeyer P, Ganter M, von Loewenich FD.** Simultaneous infection of cattle with different *Anaplasma phagocytophilum* variants. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019;**10**:1051-6.
61. **Langenwalder DB, Schmidt S, Gilli U, Pantchev N, Ganter M, Silaghi C, et al.** Genetic characterization of *Anaplasma phagocytophilum* strains from goats (*Capra aegagrus hircus*) and water buffalo (*Bubalus bubalis*) by 16S rRNA gene, *ankA* gene and multilocus sequence typing. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019;**10**:101267.
62. **Huhn C, Winter C, Wolfsperger T, Wüppenhorst N, Strašek Smrdel K, Skuballa J, et al.** Analysis of the population structure of *Anaplasma phagocytophilum* using multilocus sequence typing. *PLoS One.* 2014;**9**:e93725.
63. **Anderson JF.** The natural history of ticks. *Med Clin North Am.* 2002;**86**:205-18.
64. **Ogden NH, Bown K, Horrocks BK, Woldehiwet Z, Bennett M.** Granulocytic *Ehrlichia* infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. *Med Vet Entomol.* 1998;**12**:423-9.
65. **Katavolos P, Armstrong PM, Dawson JE, Telford SRI.** Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis.* 1998;**177**:1422-5.

66. **Baldrige GD, Scoles GA, Burkhardt NY, Schloeder B, Kurtti TJ, Munderloh UG.** Transovarial transmission of *Francisella*-like endosymbionts and *Anaplasma phagocytophilum* variants in *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol.* 2009;**46**:625-32.
67. **Severinsson K, Jaenson TG, Pettersson J, Falk K, Nilsson K.** Detection and prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in seven study areas in Sweden. *Parasit Vectors.* 2010;**3**:66.
68. **Goel R, Westblade LF, Kessler DA, Sfeir M, Slavinski S, Backenson B, et al.** Death from Transfusion-Transmitted Anaplasmosis, New York, USA, 2017. *Emerg Infect Dis.* 2018;**24**:1548-50.
69. **Fine AB, Sweeney JD, Nixon CP, Knoll BM.** Transfusion-transmitted anaplasmosis from a leukoreduced platelet pool. *Transfusion.* 2016;**56**:699-704.
70. **Shields K, Cumming M, Rios J, Wong MT, Zwicker JI, Stramer SL, et al.** Transfusion-associated *Anaplasma phagocytophilum* infection in a pregnant patient with thalassemia trait: a case report. *Transfusion.* 2015;**55**:719-25.
71. **Jereb M, Pecaver B, Tomazic J, Muzlovic I, Avsic-Zupanc T, Premru-Srsen T, et al.** Severe human granulocytic anaplasmosis transmitted by blood transfusion. *Emerg Infect Dis.* 2012;**18**:1354-7.
72. **Alhumaidan H, Westley B, Esteva C, Berardi V, Young C, Sweeney J.** Transfusion-transmitted anaplasmosis from leukoreduced red blood cells. *Transfusion.* 2013;**53**:181-6.
73. **Annen K, Friedman K, Eshoa C, Horowitz M, Gottschall J, Straus T.** Two cases of transfusion-transmitted *Anaplasma phagocytophilum*. *Am J Clin Pathol.* 2012;**137**:562-5.
74. **Horowitz HW, Kilchevsky E, Haber S, Aguerro-Rosenfeld M, Kranwinkel R, James EK, et al.** Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med.* 1998;**339**:375-8.
75. **Dhand A, Nadelman RB, Aguerro-Rosenfeld M, Haddad FA, Stokes DP, Horowitz HW.** Human granulocytic anaplasmosis during pregnancy: case series and literature review. *Clin Infect Dis.* 2007;**45**:589-93.
76. **Dugat T, Lagréé AC, Maillard R, Boulouis HJ, Haddad N.** Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015;**5**:61.

77. **Dzięgiel B, Adaszek L, Winiarczyk S.** Wild animals as reservoirs of *Anaplasma phagocytophilum* for humans. *Przegl Epidemiol.* 2016;**70**:428-35.
78. **Massung RF, Courtney JW, Hiratzka SL, Pitzer VE, Smith G, Dryden RL.** *Anaplasma phagocytophilum* in white-tailed deer. *Emerg Infect Dis.* 2005;**11**:1604-6.
79. **Silaghi C, Skuballa J, Thiel C, Pfister K, Petney T, Pfäffle M, et al.** The European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) - a suitable reservoir for variants of *Anaplasma phagocytophilum*? *Ticks Tick Borne Dis.* 2012;**3**:49-54.
80. **Rikihisa Y.** Mechanisms to create a safe haven by members of the family *Anaplasmataceae*. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;**990**:548-55.
81. **Mott J, Barnewall RE, Rikihisa Y.** Human granulocytic ehrlichiosis agent and *Ehrlichia chaffeensis* reside in different cytoplasmic compartments in HL-60 cells. *Infect Immun.* 1999;**67**:1368-78.
82. **Aguero-Rosenfeld ME.** Diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis: state of the art. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2002;**2**:233-9.
83. **Rikihisa Y.** *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. *Nat Rev Microbiol.* 2010;**8**:328-39.
84. **Severo MS, Stephens KD, Kotsyfakis M, Pedra JH.** *Anaplasma phagocytophilum*: deceptively simple or simply deceptive? *Future Microbiol.* 2012;**7**:719-31.
85. **Dahlgren FS, Mandel EJ, Krebs JW, Massung RF, McQuiston JH.** Increasing incidence of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* in the United States, 2000-2007. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;**85**:124-31.
86. **Bakken JS, Dumler S.** Human granulocytic anaplasmosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2015;**29**:341-55.
87. **Dumler JS.** The biological basis of severe outcomes in *Anaplasma phagocytophilum* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;**64**:13-20.
88. **Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken JS.** Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis.* 2007;**45**:S45-51.
89. **Centers for Disease Control and Prevention.** Ehrlichiosis and Anaplasmosis 2008 Case Definition 2009 [Available from: <https://wwwn.cdc.gov/nndss/conditions/ehrlichiosis-and-anaplasmosis/case-definition/2008/>].

90. **Madigan JE, Richter PJ, Kimsey RB, Barlough JE, Bakken JS, Dumler JS.** Transmission and passage in horses of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis.* 1995;**172**:1141-4.
91. **Barlough JE, Madigan JE, DeRock E, Dumler JS, Bakken JS.** Protection against *Ehrlichia equi* is conferred by prior infection with the human granulocytotropic *Ehrlichia* (HGE agent). *J Clin Microbiol.* 1995;**33**:3333-4.
92. **Chang YF, Novosel V, Dubovi E, Wong SJ, Chu FK, Chang CF, et al.** Experimental infection of the human granulocytic ehrlichiosis agent in horses. *Vet Parasitol.* 1998;**78**:137-45.
93. **Scorpio DG, Dumler JS, Barat NC, Cook JA, Barat CE, Stillman BA, et al.** Comparative strain analysis of *Anaplasma phagocytophilum* infection and clinical outcomes in a canine model of granulocytic anaplasmosis. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011;**11**:223-9.
94. **Kocan KM, Busby AT, Allison RW, Breshears MA, Coburn L, Galindo RC, et al.** Sheep experimentally infected with a human isolate of *Anaplasma phagocytophilum* serve as a host for infection of *Ixodes scapularis* ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012;**3**:147-53.
95. **Gorman JK, Hoar BR, Nieto NC, Foley JE.** Evaluation of *Anaplasma phagocytophilum* infection in experimentally inoculated sheep and determination of *Anaplasma* spp. seroprevalence in 8 free-ranging sheep flocks in California and Oregon. *Am J Vet Res.* 2012;**73**:1029-34.
96. **Pusterla N, Anderson RJ, House JK, Pusterla JB, DeRock E, Madigan JE.** Susceptibility of cattle to infection with *Ehrlichia equi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc.* 2001;**218**:1160-2.
97. **Pusterla N, Pusterla JB, Braun U, Lutz H.** Experimental cross-infections with *Ehrlichia phagocytophila* and human granulocytic ehrlichia-like agent in cows and horses. *Vet Rec.* 1999;**145**:311-4.
98. **Stuen S, Artursson K, Olsson Engvall E.** Experimental infection of lambs with an equine granulocytic *Ehrlichia* species resembling the agent that causes human granulocytic ehrlichiosis (HGE). *Acta Vet Scand.* 1998;**39**:491-7.
99. **Pusterla N, Lutz H, Braun U.** Experimental infection of four horses with *Ehrlichia phagocytophila*. *Vet Rec.* 1998;**143**:303-5.
100. **Scharf W, Schauer S, Freyburger F, Petrovec M, Schaarschmidt-Kiener D, Liebisch G, et al.** Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum ankA* gene clusters. *J Clin Microbiol.* 2011;**49**:790-6.

101. **von Loewenich FD, Baumgarten BU, Schröppel K, Geißdörfer W, Röllinghoff M, Bogdan C.** High diversity of *ankA* sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. J Clin Microbiol. 2003;**41**:5033-40.
102. **Casey AN, Birtles RJ, Radford AD, Bown KJ, French NP, Woldehiwet Z, et al.** Groupings of highly similar major surface protein (p44)-encoding paralogues: a potential index of genetic diversity amongst isolates of *Anaplasma phagocytophilum*. Microbiology. 2004;**150**:727-34.
103. **Bown KJ, Lambin X, Ogden NH, Petrovec M, Shaw SE, Woldehiwet Z, et al.** High-resolution genetic fingerprinting of European strains of *Anaplasma phagocytophilum* by use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis. J Clin Microbiol. 2007;**45**:1771-6.
104. **Bown KJ, Lambin X, Ogden NH, Begon M, Telford G, Woldehiwet Z, et al.** Delineating *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in coexisting, discrete enzootic cycles. Emerg Infect Dis. 2009;**15**:1948-54.
105. **Sumner JW, Nicholson WL, Massung RF.** PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock operon of *Ehrlichia* species. J Clin Microbiol. 1997;**35**:2087-92.
106. **Jahfari S, Coipan EC, Fonville M, van Leeuwen AD, Hengeveld P, Heylen D, et al.** Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. Parasit Vectors. 2014;**7**:365.
107. **Jaarsma RI, Sprong H, Takumi K, Kazimirova M, Silaghi C, Mysterud A, et al.** *Anaplasma phagocytophilum* evolves in geographical and biotic niches of vertebrates and ticks. Parasit Vectors. 2019;**12**:328.
108. **Foley JE, Nieto NC, Barbet A, Foley P.** Antigen diversity in the parasitic bacterium *Anaplasma phagocytophilum* arises from selectively-represented, spatially clustered functional pseudogenes. PLoS One. 2009;**4**:e8265.
109. **Strašek Smrdel K, von Loewenich FD, Petrovec M, Avsič Županc T.** Diversity of *ankA* and *msp4* genes of *Anaplasma phagocytophilum* in Slovenia. Ticks Tick Borne Dis. 2015;**6**:164-6.
110. **Caturegli P, Asanovich KM, Walls JJ, Bakken JS, Madigan JE, Popov VL, et al.** *ankA*: an *Ehrlichia phagocytophila* group gene encoding a cytoplasmic protein antigen with ankyrin repeats. Infect Immun. 2000;**68**:5277-83.
111. **Storey JR, Doros-Richert LA, Gingrich-Baker C, Munroe K, Mather TN, Coughlin RT, et al.** Molecular cloning and sequencing of three granulocytic

- Ehrlichia* genes encoding high-molecular-weight immunoreactive proteins. Infect Immun. 1998;**66**:1356-63.
112. **Rennoll-Bankert KE, Dumler JS.** Lessons from *Anaplasma phagocytophilum*: chromatin remodeling by bacterial effectors. Infect Disord Drug Targets. 2012;**12**:380-7.
 113. **Lin M, den Dulk-Ras A, Hooykaas PJ, Rikihisa Y.** *Anaplasma phagocytophilum* AnkA secreted by type IV secretion system is tyrosine phosphorylated by Abl-1 to facilitate infection. Cell Microbiol. 2007;**9**:2644-57.
 114. **Park J, Kim KJ, Choi KS, Grab DJ, Dumler JS.** *Anaplasma phagocytophilum* AnkA binds to granulocyte DNA and nuclear proteins. Cell Microbiol. 2004;**6**:743-51.
 115. **Dumler JS, Sinclair SH, Pappas-Brown V, Shetty AC.** Genome-Wide *Anaplasma phagocytophilum* AnkA-DNA interactions are enriched in intergenic regions and gene promoters and correlate with infection-induced differential gene expression. Front Cell Infect Microbiol. 2016;**6**:97.
 116. **Chastagner A, Dugat T, Vourc'h G, Verheyden H, Legrand L, Bachy V, et al.** Multilocus sequence analysis of *Anaplasma phagocytophilum* reveals three distinct lineages with different host ranges in clinically ill French cattle. Vet Res. 2014;**45**:114.
 117. **Majazki J, Wüppenhorst N, Hartelt K, Birtles R, von Loewenich FD.** *Anaplasma phagocytophilum* strains from small mammals exhibit specific *ankA* gene sequences. BMC Vet Res. 2013;**9**:235.
 118. **Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al.** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;**95**:3140-5.
 119. **Feil EJ.** Small change: keeping pace with microevolution. Nat Rev Microbiol. 2004;**2**:483-95.
 120. **Maiden MC, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, et al.** MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. Nat Rev Microbiol. 2013;**11**:728-36.
 121. **Maiden MCJ.** Multilocus sequence typing of bacteria. Annu Rev Microbiol. 2006;**60**:561-88.
 122. **Cooper JE, Feil EJ.** Multilocus sequence typing--what is resolved? Trends Microbiol. 2004;**12**:373-7.

123. **Rymaszewska A.** Genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* strains from Poland for selected genes. *Folia Biol (Krakow)*. 2014;**62**:37-48.
124. **Dunning Hotopp JC, Lin M, Madupu R, Crabtree J, Angiuoli SV, Eisen JA, et al.** Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. *PLoS Genet*. 2006;**2**:e21.
125. **Al-Khedery B, Barbet AF.** Comparative genomics identifies a potential marker of human-virulent *Anaplasma phagocytophilum*. *Pathogens*. 2014;**3**:25-35.
126. **Foley J, Stephenson N, Cubilla MP, Quorollo B, Breitschwerdt EB.** A putative marker for human pathogenic strains of *Anaplasma phagocytophilum* correlates with geography and host, but not human tropism. *Ticks Tick Borne Dis*. 2016;**7**:390-3.
127. **Matei IA, Estrada-Peña A, Cutler SJ, Vayssier-Taussat M, Varela-Castro L, Potkonjak A, et al.** A review on the eco-epidemiology and clinical management of human granulocytic anaplasmosis and its agent in Europe. *Parasit Vectors*. 2019;**12**:599.
128. **Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K.** MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018;**35**:1547-9.
129. **Massung RF, Slater K, Owens JH, Nicholson WL, Mather TN, Solberg VB, et al.** Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *J Clin Microbiol*. 1998;**36**:1090-5.
130. **Felsenstein J.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap *Evolution*. 1985;**39**:783-91.
131. **Mukhacheva TA, Shaikhova DR, Kovalev SY.** Asian isolates of *Anaplasma phagocytophilum*: Multilocus sequence typing. *Ticks Tick Borne Dis*. 2019;**10**:775-80.
132. **Mukhacheva TA, Shaikhova DR, Kovalev SY, von Loewenich FD.** Phylogeographical diversity of *Anaplasma phagocytophilum* in the Asian part of Russia based on multilocus sequence typing and analysis of the *ankA* gene. *Infect Genet Evol*. 2020;**80**:104234.
133. **Langenwalder DB, Schmidt S, Silaghi C, Skuballa J, Pantchev N, Matei IA, et al.** The absence of the *drhm* gene is not a marker for human-pathogenicity in European *Anaplasma phagocytophilum* strains. *Parasit Vectors*. 2020;**13**:238-.

134. **Massung RF, Levin ML, Munderloh UG, Silverman DJ, Lynch MJ, Gaywee JK, et al.** Isolation and propagation of the Ap-Variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum* in a tick cell line. *J Clin Microbiol.* 2007;**45**:2138-43.
135. **Hoffman T, Wilhelmsson P, Barboutis C, Fransson T, Jaenson TGT, Lindgren PE, et al.** A divergent *Anaplasma phagocytophilum* variant in an *Ixodes* tick from a migratory bird; Mediterranean basin. *Infect Ecol Epidemiol.* 2020;**10**:1729653.
136. **Poitout FM, Shinozaki JK, Stockwell PJ, Holland CJ, Shukla SK.** Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in western Washington state. *J Clin Microbiol.* 2005;**43**:796-801.
137. **Lagree AC, Rouxel C, Kevin M, Dugat T, Girault G, Durand B, et al.** Co-circulation of different *A. phagocytophilum* variants within cattle herds and possible reservoir role for cattle. *Parasit Vectors.* 2018;**11**:163.
138. **Stuen S, Van De Pol I, Bergström K, Schouls L.** Identification of *Anaplasma phagocytophila* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) variants in blood from sheep in Norway. *J Clin Microbiol.* 2002;**40**:3192-7.
139. **Jouglin M, Chagneau S, Faille F, Verheyden H, Bastian S, Malandrin L.** Detecting and characterizing mixed infections with genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in roe deer (*Capreolus capreolus*) by developing an *ankA* cluster-specific nested PCR. *Parasit Vectors.* 2017;**10**:377.
140. **Chastagner A, Pion A, Verheyden H, Lourtet B, Cargnelutti B, Picot D, et al.** Host specificity, pathogen exposure, and superinfections impact the distribution of *Anaplasma phagocytophilum* genotypes in ticks, roe deer, and livestock in a fragmented agricultural landscape. *Infect Genet Evol.* 2017;**55**:31-44.
141. **Zeman P, Pecha M.** Segregation of genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* circulating among wild ruminants within a Bohemian forest (Czech Republic). *Int J Med Microbiol.* 2008;**298 S1**:203-10.
142. **Stuen S, Torsteinbø WO, Bergström K, Bårdsen K.** Superinfection occurs in *Anaplasma phagocytophilum* infected sheep irrespective of infection phase and protection status. *Acta Vet Scand.* 2009;**51**:41.
143. **Strašek Smrdel K, Bidovec A, Malovrh T, Petrovec M, Duh D, Avsic Zupanc T.** Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in wild boar in Slovenia. *Clin Microbiol Infect.* 2008;**15**:50-2.

144. **Michalik J, Stańczak J, Cieniuch S, Racewicz M, Sikora B, Dabert M.** Wild boars as hosts of human-pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* variants. *Emerg Infect Dis.* 2012;**18**:998-1001.
145. **Silaghi C, Scheuerle MC, Friche Passos LM, Thiel C, Pfister K.** PCR detection of *Anaplasma phagocytophilum* in goat flocks in an area endemic for tick-borne fever in Switzerland. *Parasite.* 2011;**18**:57-62.
146. **Courtney JW, Dryden RL, Montgomery J, Schneider BS, Smith G, Massung RF.** Molecular characterization of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes scapularis* ticks from Pennsylvania. *J Clin Microbiol.* 2003;**41**:1569-73.
147. **Rymaszewska A.** Divergence within the marker region of the *groESL* operon in *Anaplasma phagocytophilum*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008;**27**:1025-36.

7 Anhang

Teile dieser Dissertation wurden publiziert:

- I **Langenwalder DB, Schmidt S, Gilli U, Pantchev N, Ganter M, Silaghi C, et al.** Genetic characterization of *Anaplasma phagocytophilum* strains from goats (*Capra aegagrus hircus*) and water buffalo (*Bubalus bubalis*) by 16S rRNA gene, *ankA* gene and multilocus sequence typing. Ticks Tick Borne Dis. 2019;**10**:101267.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877959X19301530?via%3Dihub>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877959X19301530?via%3Dihub>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877959X19301530?via%3Dihub>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877959X19301530?via%3Dihub>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877959X19301530?via%3Dihub>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877959X19301530?via%3Dihub>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877959X19301530?via%3Dihub>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877959X19301530?via%3Dihub>

- II **Langenwalder DB, Silaghi C, Nieder M, Pfeffer M, von Loewenich FD.** Co-infection, reinfection and superinfection with *Anaplasma phagocytophilum* strains in a cattle herd based on *ankA* gene and multilocus sequence typing. *Parasit Vectors*, 2020,**13**:157.

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04032-2>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04032-2>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04032-2>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04032-2>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04032-2>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04032-2>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04032-2>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04032-2>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04032-2>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04032-2>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04032-2>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04032-2>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04032-2>

- III **Langenwalder DB, Schmidt S, Silaghi C, Skuballa J, Pantchev N, Matei IA, et al.** The absence of the *drhm* gene is not a marker for human-pathogenicity in European *Anaplasma phagocytophilum* strains. *Parasit Vectors*. 2020;**13**:238.

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04116-z>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04116-z>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04116-z>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04116-z>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04116-z>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04116-z>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04116-z>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04116-z>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04116-z>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04116-z>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04116-z>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04116-z>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04116-z>

Originalpublikation – in elektronischer Version entfernen.

Online verfügbar unter:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04116-z>