

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

Morphologische und molekulare Charakterisierung von *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* und *Rhipicephalus muhsamae* aus Ägypten

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

eingereicht von
Johanna Maria Langguth
aus Halle (Saale)

Leipzig, 2018

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Walter Brehm

Betreuer: Prof. Dr. Martin Pfeffer

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

Ph.D. Ard Nijhof
Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin
Fachbereich Veterinärmedizin
Freie Universität Berlin

Tag der Verteidigung: 24.04.2018

Für meine Familie
und Finn

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Zecken	3
2.1.1	Taxonomie	3
2.1.2	Zeckenarten in Ägypten	3
2.1.3	Rhipicephalinae	4
2.1.3.1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato	4
2.1.3.1.1	Taxonomie, Morphologie und genetische Studien von Zecken der <i>R. sanguineus</i> -Gruppe	4
2.1.3.1.2	Entwicklungszyklus und Wirte	11
2.1.3.1.3	Verbreitung und Habitat	13
2.1.3.1.4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato als Vektor	14
2.1.3.2	<i>Rhipicephalus muhsamae</i>	15
2.1.3.2.1	Taxonomie und Morphologie	15
2.1.3.2.2	Entwicklungszyklus und Wirte	16
2.1.3.2.3	Verbreitung und Habitat	16
2.1.3.2.4	<i>Rhipicephalus muhsamae</i> als Vektor	17
3	PUBLIKATIONEN	18
3.1	Stellungnahme zum Eigenanteil an den Arbeiten zur Publikation	18
3.1.1	Publikation 1	19
3.2	Stellungnahme zum Eigenanteil an den Arbeiten zur Publikation	24
3.2.1	Publikation 2	25
4	DISKUSSION	31
5	ZUSAMMENFASSUNG	36
6	SUMMARY	38
7	LITERATURVERZEICHNIS	40

8	ANHANG	50
9	DANKSAGUNG	57

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	<i>Amblyomma</i>
Abb.	Abbildung
B.	<i>Babesia</i>
acc. no.	Accession number
bp	Base pair(s) (Basenpaare)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
COI/coxI	cytochrome c oxidase subunit-1
Ct-Wert	cycle threshold (Zyklusanzahl, bei der der Schwellenwert überschritten wird)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
engl.	englisch
et al.	et alii; und andere
gltA Gen	Citrat Synthase Gen
H.	<i>Hyalomma</i>
ITS2	second internal transcribed spacer rRNA Region
kDa	Kilodalton
k-DNA	Kinetoplasten-DNA
m ²	Quadratmeter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
OmpA Gen	Outer membrane protein A Gen
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
R.	<i>Rhipicephalus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
s.	siehe
s.l.	sensu lato (im weiteren Sinne)
sp.	species (Art), nicht näher spezifizierte Art einer Gattung
spp.	species pluralis

ssp.	subspecies (Unterart)
s.s.	sensu stricto (im engeren Sinne)
u.a.	unter anderem
UdSSR	Union der Sozialistischen Sowjetrepubliken (1919–1991)
v.Chr.	vor Christus
z.B.	zum Beispiel
12S rRNA	12S ribosomale Ribonukleinsäure (S steht für Svedberg unit)
16S rRNA	16S ribosomale Ribonukleinsäure (S steht für Svedberg unit)
18S rRNA	18S ribosomale Ribonukleinsäure (S steht für Svedberg unit)

1 EINLEITUNG

Erkrankungen, die durch Zecken übertragen werden, nehmen weltweit an Bedeutung zu. Die Vielfalt der Erreger, die durch Zecken übertragen wird, ist größer als bei jeder anderen Arthropodenart (JONGEJAN und UILENBERG 2004). Als Überträger von humanpathogenen Erregern stehen sie nach den Stechmücken mittlerweile an zweiter Stelle (PAROLA und RAOULT 2001). Daraus ergibt sich die Notwendigkeit die Verbreitung der Vektoren und die Prävalenzen bestimmter Erreger in ihnen zu untersuchen, um das Risiko einer Infektion von Mensch und Tier abschätzen zu können.

Die braune Hundezecke, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), gilt als eine der weltweit am weitesten verbreiteten Arten und als Überträger von zahlreichen Krankheitserregern mit und ohne zoonotischen Charakter, wie z.B. *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia rickettsii* und *Coxiella burnetii* (DANTAS-TORRES 2008). Bedingt durch diese breite Vektorkompetenz und die Affinität zum Wirtstier Hund, sind *R. sanguineus* s.l. Zecken von hoher medizinischer, veterinärmedizinischer und auch wirtschaftlicher Bedeutung. Steigende Temperaturen führen auf der einen Seite zur weiteren Verbreitung von *R. sanguineus* s.l. in immer nördlichere Lebensräume und auf der anderen Seite zu einer höheren Tendenz auch den Menschen als Wirt zu nutzen (PAROLA et al. 2008). Trotz zahlreicher phylogenetischer Studien ist der taxonomische Status und geografische Ursprung dieser Zeckenart nicht eindeutig geklärt. Deshalb wird zum jetzigen Zeitpunkt nicht von einer Art, sondern von einer Gruppe sehr ähnlicher Zeckenarten als *R. sanguineus*-Gruppe bzw. von *R. sanguineus* sensu lato gesprochen (NAVA et al. 2015). Aufgrund phylogenetischer Untersuchungen der mitochondrialen 12S- und 16S rRNA Gene werden aktuell zwei große Cluster und dadurch vermutlich mindestens zwei unterschiedliche Arten unter dem Namen *R. sanguineus* beschrieben. Die sogenannte „southern/temperate lineage“ und die „northern/tropical lineage“ (MORAES-FILHO et al. 2011, NAVA et al. 2012, SANCHES et al. 2016). Eine Studie geht sogar von mindestens vier morphologisch und genetisch unterscheidbaren Arten unter demselben Namen aus, *R. sanguineus* sensu lato, *Rhipicephalus* sp. I, *Rhipicephalus* sp. II und *Rhipicephalus* sp. III (DANTAS-TORRES et al. 2013).

Es herrscht bis heute kein Konsens, ob diese Art ihren Ursprung in Afrika oder Europa hat (MOREL und VASSILIADES 1962, WALKER et al. 2000, DANTAS-TORRES 2008). Das Genus *Rhipicephalus* wird von WALKER et al. (2000) ursprünglich dem afrikanischen Kontinent zugeordnet. Adaptiert an den Haushund kommt *R. sanguineus* s.l. somit mindestens in allen von Menschen besiedelten Regionen Afrikas vor (WALKER et al. 2003). Trotzdem sind nur vergleichsweise wenige genetische Daten zu *R. sanguineus* s.l. aus den unterschiedlichen afrikanischen Ländern verfügbar. Zeckenfunde an Hundemumien aus dem alten Ägypten um 300 v.Chr. konnten anhand morphologischer Charakteristika, wie z.B. Form der Stigmenplatten, Genitalporus, Adanal- und akzessorische Adanalplatten, von

OTRANTO et al. (2014) als *Rhipicephalus* sp. II in der *R. sanguineus*-Gruppe bestimmt werden. Dies entspricht der „temperate lineage“ (s. Kapitel 2.1.3.1.1). Eine aktuelle Studie, die erstmals Zecken aus Ägypten anhand genetischer DNA Marker untersucht, ordnet *R. sanguineus* s.l. durch Vergleiche von Sequenzen aus Israel, dem Iran und der Türkei ebenfalls der „temperate lineage“ zu (ABDULLAH et al. 2016).

Ägypten liegt als Bindeglied zwischen dem nordafrikanischen Raum und dem südlich angrenzenden Subsahara-Afrika, im Osten zu Israel sowie über die Mittelmeerrouten zum europäischen Raum im Norden. Somit bietet sich dieses Land für Untersuchungen an Zecken und durch Zecken übertragenen Erregern an. Phylogenetische Daten aus Ägypten und Nordafrika können einen wesentlichen Anteil an der Klärung von Ursprung und Verbreitung von *Rhipicephalus sanguineus* s.l. haben und sollen mit dieser Arbeit über Zecken im oberägyptischen Luxor ergänzt werden.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit war der Nachweis von *Rhipicephalus muhsamae*, einer bisher für Ägypten nicht beschriebenen Art im Genus *Rhipicephalus*, die nahe verwandt ist mit *Rhipicephalus sanguineus*. Da bislang nur wenig über die Bedeutung von *R. muhsamae* als Vektor bekannt ist, wurden diese Zecken auch molekularbiologisch auf das Vorhandensein bestimmter Pathogene untersucht.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Zecken

2.1.1 Taxonomie

Zecken sind obligat hämatophage Ektoparasiten. Sie lassen sich taxonomisch in den Stamm der Arthropoda und den Unterstamm Amandibulata einordnen. Zusammen mit den Milben bilden sie in der Klasse der Arachnidea die Unterklasse Acari. Die sich anschließende Ordnung der Ixodida (= Metastigmata, aufgrund der Stigmenplatte hinter den Coxen des vierten Beinpaars) wird in drei große Familien eingeteilt, die Schildzecken (Ixodidae), Lederzecken (Argasidae) und die Nutalliellidae (LUCIUS und LOOS-FRANK 2008). Die für diese Arbeit relevanten Zeckenspezies sind Teil der Unterfamilie Rhipicephalinae in der Familie der Ixodidae. Weitere Unterfamilien sind die Ixodinae, Hyalomminae, Amblyomminae und Haemaphysalinae. Bisher sind ca. 867 lebende Arten beschrieben, darunter allein 682 in der Familie der Ixodidae (GUGLIELMONE und NAVA 2014, NIJHOF et al. 2017).

2.1.2 Zeckenarten in Ägypten

Erste Beschreibungen von Zecken finden sich in ägyptischen Gräbern von vor 3500 Jahren, in denen Wandzeichnungen von Hyänen-ähnlichen Tieren mit Zecken am Ohr gefunden wurden (ARTHUR 1965). Zeckenfunde an Hundemumien aus dem vierten Jahrhundert v. Chr. wurden dem Genus *Rhipicephalus* zugeordnet und als *Rhipicephalus sanguineus* s.l. bezeichnet (OTRANTO et al. 2014).

HOOGSTRAAL (1956) beschrieb in seinem Buch „African Ixodoidea“ die Arten *Argas brumpti*, *Hyalomma dromedarii*, *H. impeltatum*, *H. marginatum rufipes* (heute: *H. rufipes*) und *Rhipicephalus sanguineus*. *Haemaphysalis leachi leachi* (heute: *Haemaphysalis leachi* Audouin) wurde ebenfalls von HOOGSTRAAL (1958) beschrieben. Im selben Jahr entstand auch eine Auflistung von 30 Zeckenarten aus Ägypten (HOOGSTRAAL und KAISER 1958). *H. marginatum rufipes* (heute: *H. rufipes*) wurde vor allem auf Zugvögeln beobachtet (HOOGSTRAAL et al. 1961).

Weitere Arten auf der Sinai-Halbinsel wurden von SHOUKRY et al. (1993) beschrieben: *H. anatolicum anatolicum* (heute: *H. anatolicum*), *H. anatolicum excavatum* (heute: *H. excavatum*), *H. marginatum turanicum* (heute: *H. turanicum*), *H. schulzei*, *Rhipicephalus turanicus*, *Boophilus annulatus* (heute: *Rhipicephalus annulatus*), *Ornithodors erraticus* (heute: *Carios erraticus* Lucas) und *Argas persicus*.

Aktuelle Studien zum Vorkommen der Zeckenarten in Ägypten führen ähnliche Arten auf. Zusätzlich zu oben genannten wurden *H. truncatum*, *H. marginatum marginatum* (heute:

H. marginatum), *R. guilhoni*, *R. camicasi*, *Amblyomma lepidum*, *A. marmoreum*, *A. variegatum*, *Argas hermanni* und *Argas arboreus* gefunden. Hyalomma-Spezies wurden vor allem auf Kamelen und Kühen beschrieben. Kühe waren der alleinige Wirt von *Boophilus annulatus* (heute: *Rhipicephalus annulatus*). Zecken vom Genus *Rhipicephalus* parasitierten vor allem auf Hunden, teilweise auch auf Kamelen und Schafen. Argas Spezies befanden sich ausschließlich auf Geflügel (EL KAMMAH et al. 2001, LOFTIS et al. 2006).

R. sanguineus s.l. ist, auch in Ägypten, die am häufigsten auf Hunden parasitierende Zecke (HOOGSTRAAL und KAISER 1958, HARIDY et al. 2009, ABDULLAH et al. 2016).

2.1.3 Rhipicephalinae

2.1.3.1 Rhipicephalus sanguineus sensu lato

2.1.3.1.1 Taxonomie, Morphologie und genetische Studien von Zecken der *R. sanguineus*-Gruppe

Rhipicephalus sanguineus (LATREILLE 1806), auch bekannt als braune Hundezecke oder engl. „kennel tick“, zählt im Genus *Rhipicephalus* zur Unterfamilie der Rhipicephalinae in der Familie der Ixodidae. Der Name leitet sich von den griechischen Wörtern *Rhipis* (Fächer) und *kephale* (Kopf) sowie vom lateinischen Wort *sanguineus* (blutig) ab.

Es handelt sich um mittelgroße rötlich bis dunkelbraune Zecken. Männchen und Weibchen sind ca. 3-4 mm groß, im gesaugten Zustand erreichen adulte Weibchen eine Länge von bis zu 10 mm. Charakteristisch ist eine hexagonale Basis capituli mit kurzen Mundwerkzeugen und Pedipalpen. Das Capitulum ist bei beiden Geschlechtern insgesamt breiter als lang. Die Coxen des ersten Beinpaares sind tief gekerbt und tragen einen deutlichen Fortsatz (BOCH et al. 2006).

Die erste, wenig detaillierte Beschreibung im Jahr 1806 von *Ixodes sanguineus* nach Latreille lautete wie folgt: „Sanguineus, punctatus, postice lineolis tribus impressus; dorso antico macula nulla thoracica, distincta“ (LATREILLE 1806). Übersetzt bedeutet dies in etwa: „blutrot, gepunktet, posterior mit drei eingedrückten Linien, anterodorsal kein deutlicher thorakaler Fleck“.

Durch KOCH (1844) erfolgte die Einordnung in das Genus *Rhipicephalus*. Die erste morphologische Beschreibung reicht als fundierte Grundlage zur Beschreibung dieser Art nicht aus und es existiert kein Originalmaterial mehr, mit dessen Hilfe eine bessere Charakterisierung vorgenommen werden könnte. Deshalb muss fachlich korrekt von der *Rhipicephalus sanguineus*-Gruppe oder *R. sanguineus sensu lato* gesprochen werden (DANTAS-TORRES 2010, DANTAS-TORRES et al. 2013, NAVA et al. 2015). Der Name *Rhipicephalus sanguineus sensu stricto* kann keiner Population eindeutig zugeordnet werden. Alle folgenden Erwähnungen des Namens *R. sanguineus* in dieser Arbeit beziehen sich also auf eine Gruppe sehr ähnlicher Arten deren taxonomischer Status unter ständiger

Reevaluation liegt (s. **Abb. 1**). Unter dem Synonym *R. sanguineus* s.s. wurden im Laufe der Jahre zahlreiche Arten und Unterarten in verschiedenen Publikationen geführt, da einige Arten vor allem auf morphologischer Ebene auch für versierte Spezialisten kaum zu unterscheiden sind. Nach seiner Beschreibung einer neuen Art namens *Rhipicephalus sulcatus* Neumann im Jahr 1908, teilte Neumann drei Jahre später *R. sanguineus* erstmals in 3 Unterarten ein: *R. sanguineus sanguineus* Latreille, 1806, *R. sanguineus punctatissimus* Gerstäcker, 1873 und *R. sanguineus brevicollis* Neumann, 1897 (NEUMANN 1908; 1911). Eine weitere Variante folgte durch ZUMPT (1939;1940), der Zecken in der UdSSR verglich und folgende Unterarten einteilte: *R. sanguineus sanguineus*, *R. sanguineus rossicus* Yakimov und Kohl-Yakimov, 1911 und später *R. sanguineus schulzei* Olenov, 1929. Während CAMICAS (1998) der *R. sanguineus*-Gruppe noch 17 Arten zuordnete, werden in aktuelleren Studien meist 11 oder 12 Arten gelistet (s. **Tabelle 1** nach PEGRAM et al. 1987b) (CAMICAS 1998, WALKER et al. 2000, GRAY et al. 2013, GUGLIELMONE und NAVA 2014). Die von NEUMANN (1911) beschriebenen Unterarten wurden in WALKER et al. (2000) jeweils als Synonym von *R. sanguineus* s.s. übernommen. Den Grundstein für heutige Überlegungen und die Einordnung in die *R. sanguineus*-Gruppe legten Wissenschaftler wie FELDMAN-MUHSAM (1952), HOOGSTRAAL (1956) sowie MOREL und VASSILIADES (1962), welche die Gedanken von russischen Autoren, vor allem von Pomerantsev weiterführten (NAVA et al. 2015).

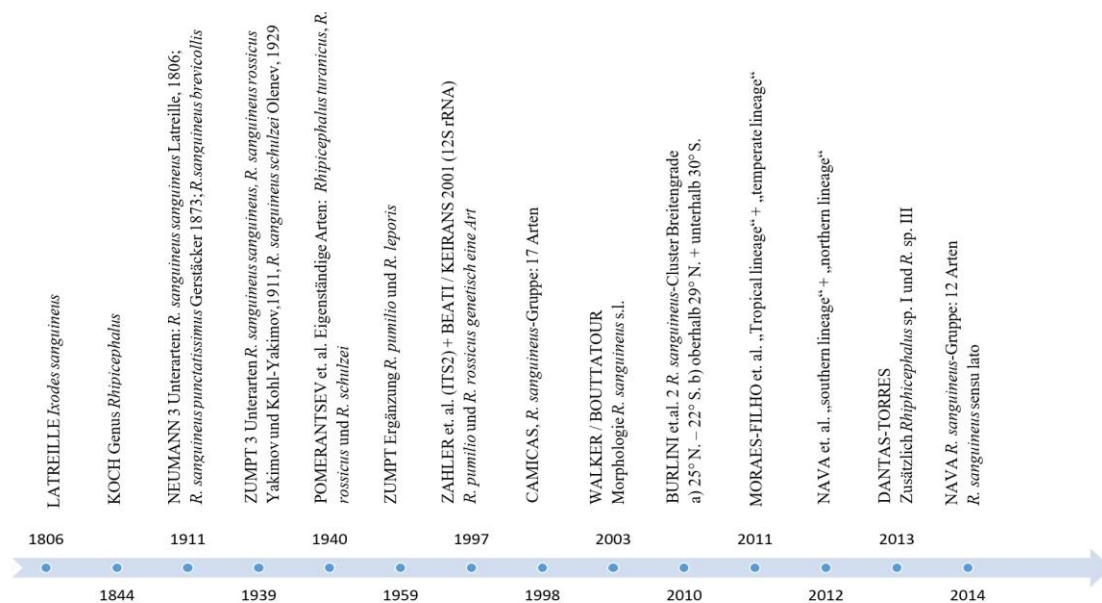


Abb. 1: Chronologische Darstellung der taxonomischen Entwicklung der *Rhipicephalus sanguineus*-Gruppe

Rhipicephalus sanguineus sensu stricto (Latreille, 1806)
Rhipicephalus sulcatus Neumann, 1908
Rhipicephalus rossicus Yakimov and Kohl-Yakimov, 1911
Rhipicephalus schulzei Olenov, 1929
Rhipicephalus pumilio Schulze, 1935
Rhipicephalus pusillus Gil Collado, 1936
Rhipicephalus turanicus Pomerantsev, 1940
Rhipicephalus leporis Pomerantsev, 1946
Rhipicephalus guilhoni Morel and Vassiliades, 1963
Rhipicephalus moucheti Morel, 1965
Rhipicephalus bergeoni Morel and Balis, 1976
Rhipicephalus camicasi Morel, Mouchet and Rodhain, 1976

Tabelle 1 Arten der *R. sanguineus*-Gruppe (nach PEGRAM et al., 1987b)

Durch POMERANTSEV et al. (1940) erfolgte eine erste Separierung von *Rhipicephalus turanicus*, welche laut Beobachtungen dieser Studie auf Huftieren parasitiert und *R. sanguineus*, als vorrangige Hundezecke im mediterranen Raum (GRAY et al. 2013, DANTAS-TORRES 2013). Zudem wurden *R. rossicus* und *R. schulzei* durch POMERANTSEV et al. (1940) und FILIPPOVA (1997) wieder zu eigenständigen Arten erhoben, entgegen der Studien von Zumpt. Zu dieser Zeit wurden außerdem *R. pumilio* und *R. leporis* der *R. sanguineus*-Gruppe hinzugefügt (ZUMPT 1950, FILIPPOVA und PANOVA 1983, NAVA et al. 2015). FELDMAN-MUHSAM (1952) beschrieb *R. secundus* als nahverwandte Art zu *R. sanguineus* s.s., zu unterscheiden durch die Form des Genitalporus. Angestoßen durch die Erkenntnisse von PEGRAM et al. (1987a), wird *R. secundus* heute als Synonym von *R. turanicus* betrachtet (CAMICAS 1998). *R. turanicus* wurde auf der Grundlage von Untersuchungen an Populationen in Turkmenistan einer genaueren Charakterisierung unterzogen (FILIPPOVA und PANOVA 1983, NAVA 2015). In seiner Beschreibung über Zecken im Sudan bemerkte HOOGSTRAAL (1956) deutliche innerartliche morphologische Unterschiede (u.a. Individualgröße, Anzahl und Dichte der Punktation, Form der Adanalplatten). Ebenso beschrieben PEGRAM et al. (1987b) einige Jahre später unter anderem Unterschiede in der Form der weiblichen Genitalöffnung und untersuchten dabei *R. sanguineus* von fünf Kontinenten.

Auch in Südamerika gibt es, bestätigt durch mehrere Studien, sowohl auf morphologischer als auch biologischer und genetischer Basis, mindestens zwei *R. sanguineus* Arten. So wurden zwischen teilweise gesaugten Weibchen aus Argentinien und Brasilien gravierende Unterschiede von Körpergröße oder Form des Genitalapparates festgestellt (DE OLIVEIRA et al. 2005). Die daraus resultierende Annahme von zwei existierenden Arten konnte durch Paarungsversuche in einer Studie von SZABO et al. (2005) gestützt werden, bei denen sterile Hybride gezeugt wurden und deutliche Unterschiede in der mitochondrialen DNA von Zecken der beiden genannten Länder detektiert werden konnten. Außerdem wurden in dieser Studie genetische Übereinstimmungen zwischen den brasilianischen *R. sanguineus* zu

R. turanicus aus Afrika und den argentinischen *R. sanguineus* zu Populationen aus Europa gefunden. Die Charakterisierung und Differenzierung der *R. sanguineus*-Gruppe anhand genetischer Marker gilt seit einigen Jahren als Standard. Erste genetische Vergleiche beruhten auf Untersuchungen der zweiten internal transcribed spacer rRNA Region (ITS2), die von ZÄHLER et al. (1997) entwickelt wurde. Die Sequenzierung ergab eine enge genetische Verwandtschaft zwischen *R. pumilio* und *R. rossicus* auf der einen Seite und zwischen *R. sanguineus* s.s. (aus Burkina Faso und Aserbaidschan) und *R. turanicus* (Turkmenistan) auf der anderen Seite (ZÄHLER et al. 1997). Die Zusammenführung von *R. pumilio* und *R. rossicus* zu einer einzigen Art konnten BEATI und KEIRANS (2001) durch Sequenzen des mitochondrialen 12S rRNA Gens bestätigen. Gleiches gilt jedoch nicht für die Behauptung *R. sanguineus* s.s. und *R. turanicus* seien nur eine Art. Diese Vermutung lässt sich aufgrund von Vergleichen des 12S rRNA Gens nur für einzelne geografische Bereiche bestätigen. So unterscheiden sich Populationen aus dem östlichen mediterranen Raum deutlich von afrikanischen Spezies mit Unterschieden zwischen 5,9 % und 8,3 %. Mediterrane Populationen im Nordwesten und turkmenische Populationen weichen hingegen kaum voneinander ab (2,4 %), was die These einer gleichen Art oder einer nahen Verwandtschaft nicht ausschließt. In Anbetracht der hohen innerartlichen Variabilität einzelner Zeckenarten postulieren BEATI und KEIRANS (2001) außerdem, dass Sequenzunterschiede des 12S rRNA Gensegments von bis zu 7,7 % noch innerhalb einer Art stattfinden können. Größere genetische Abweichungen sprechen für verschiedene Arten. Anwendung findet diese Hypothese auch in einer Studie zu molekularen Unterschieden zwischen brasilianischen *R. sanguineus*-Populationen zu Zecken der *R. sanguineus*-Gruppe aus Amerika als auch weltweit (BURLINI et al. 2010). So zeigten sich innerhalb Brasiliens innerartliche genetische Abweichungen des 12S rRNA Gens von bis zu 6,6 % (BURLINI et al. 2010).

Insgesamt konnten im weltweiten Vergleich zwei *R. sanguineus*-Cluster erarbeitet werden, welche sogar geografisch an Breitengraden nachzuvollziehen sind. Analysiert wurden hierzu mitochondriale 12S rRNA und 16S rRNA Genfragmente. Die erste Gruppe beinhaltet *R. sanguineus* aus Brasilien, Thailand und Taiwan, sowie *R. turanicus* aus Zambia und Zimbabwe und ist zwischen dem 25° nördlicher bis 22° südlicher Breite existent. Oberhalb von 29° nördlicher sowie unterhalb 30° südlicher Breite sind die Populationen der zweiten genetisch verwandten Gruppe verbreitet. Dazu zählen *R. sanguineus* aus Argentinien und Uruguay, Populationen aus den USA und Frankreich, sowie Ägypten, als auch *R. turanicus* aus Frankreich und Israel. Zusätzlich wurde eine dritte Gruppe von *R. turanicus* Proben ebenfalls aus Israel und der Türkei detektiert (BURLINI et al. 2010). Als sogenannte „tropical lineage“ und „temperate lineage“ konnten diese zwei Cluster in folgenden Studien bestätigt werden. Die „tropical lineage“ formte sich mit *R. sanguineus* Zecken vom Norden Mexikos, Zentralamerika und tropischen Klimazonen Südamerikas, welche nah verwandt sind mit Populationen aus Südafrika und Mosambik. Mit Bezug zu westeuropäischen *R. sanguineus* Zecken aus Frankreich, Spanien und Italien korrelierten Zecken in der „temperate lineage“ mit *R. sanguineus* aus den kälteren und südlichsten Regionen des südamerikanischen Kontinents (MORAES-FILHO et al. 2011).

NAVA et al. (2012) nehmen eine ähnliche Einteilung in zwei Hauptgruppen vor. Die sogenannte „southern lineage“ mit Haplotypen aus Argentinien, Chile und Uruguay, welche auf Basis von 12S rRNA und 16S rRNA Gensequenzen mit Sequenzen aus Westeuropa eine phylogenetische Einheit bilden und die „northern lineage“, in welche Haplotypen aus Brasilien, Paraguay, Kolumbien, Nordargentinien sowie aus Südafrika und Mosambik fallen. Die Annahme, dass *R. sanguineus* s.s. ursprünglich aus Frankreich stammt, führte zu der Aussage, dass die „southern lineage“ vermutlich die ursprünglichen *R. sanguineus* repräsentierten.

In einer Studie von 2013 konnten anhand morphologischer und genetischer Daten von auf Hunden parasitierenden *Rhipicephalus*-Arten, neben den beiden bekannten genetischen Linien, zwei weitere charakterisiert werden: *Rhipicephalus* sp. I und *R. sp.* III. Diese unterschieden sich deutlich von *R. sanguineus* s.l. und *R. turanicus*. *R. sanguineus* s. l. dieser Studie stimmten mit der sogenannten „northern lineage“ genetisch überein und waren weltweit vertreten, die Zecken der Gruppe *R. sp.* II mit der „southern lineage“ (DANTAS-TORRES et al. 2013). Eine aktuelle Studie von SANCHES et al. (2016) beschreibt ebenfalls diese zwei Cluster und ordnet in den sogenannten „tropical strain“ weitere *R. sanguineus* aus Thailand ein. Zudem wird die These von mindestens zwei Arten unter dem Namen *R. sanguineus* durch morphometrische Analysen gestützt, welche vor allem bei den Weibchen signifikante Unterschiede zwischen den Populationen der „tropical lineage“ und der „temperate lineage“ aufweisen, gemessen unter anderem an der Länge und Breite von Idiosoma und Scutum (SANCHES et al. 2016). HORNOK et al. (2017) ordnen *Rhipicephalus* sp. I und II, in Anlehnung an die Studie von DANTAS-TORRES et al. (2013), als Untergruppen dem „temperate strain“ zu. Beide sind laut der Studie im Mittelmeerraum vertreten, *Rhipicephalus* sp. I im Osten und *Rhipicephalus* sp. II im mittleren und westlichen Teil (HORNOK et al. 2017).

Detaillierte Beschreibungen zu Synonymen und morphologischen Charakteristika, sowie innerartliche Variationen der *R. sanguineus*-Gruppe stellen WALKER et. al im Jahr 2000 veröffentlichten Buch „The Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae): A Guide to the Brown Ticks of the World“ dar. Die Morphologie von *R. sanguineus* s.l. nach WALKER et al. (2003) lautet wie folgt (s. **Abb. 2a/b**): Die Basis capituli der Weibchen hat breite seitliche Winkel, die der Männchen ist deutlich abgerundet. Bei den Weibchen sind die Palpen etwas länger als bei den Männchen. Das nicht ornamentierte Scutum der Weibchen ist länger als breit und hat einen kurvenreichen hinteren Rand. Die leicht konvexen Augen sind dorsal von einigen Punktationen umrandet. Die Zervikalfurche erscheint leicht eingedrückt und hat die Form einer Skalpellschneide. Entlang der Marginalfurche sind größere Punktationen. Die Genitalöffnung auf der ventralen Körperseite hat eine breite U-Form (s. **Abb. 3**).

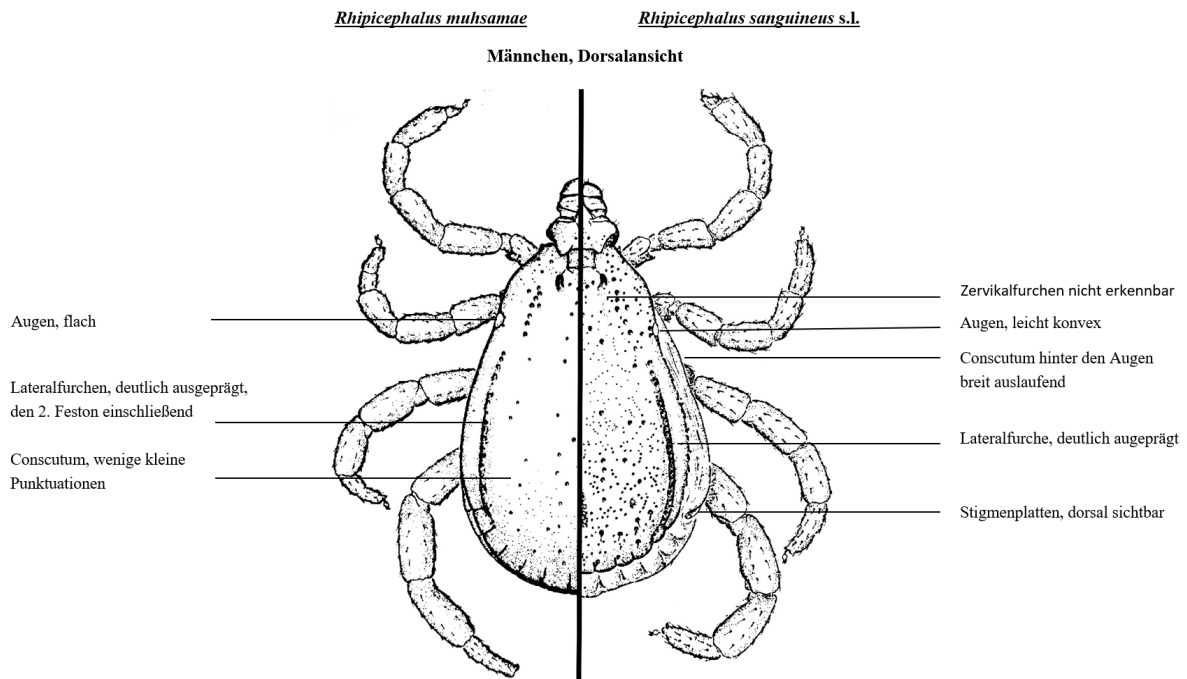


Abb. 2a: Vergleichende Dorsalansicht Männchen von *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (rechts) und *Rhipicephalus muhsamae* (links), modifiziert nach WALKER et al. (2000).

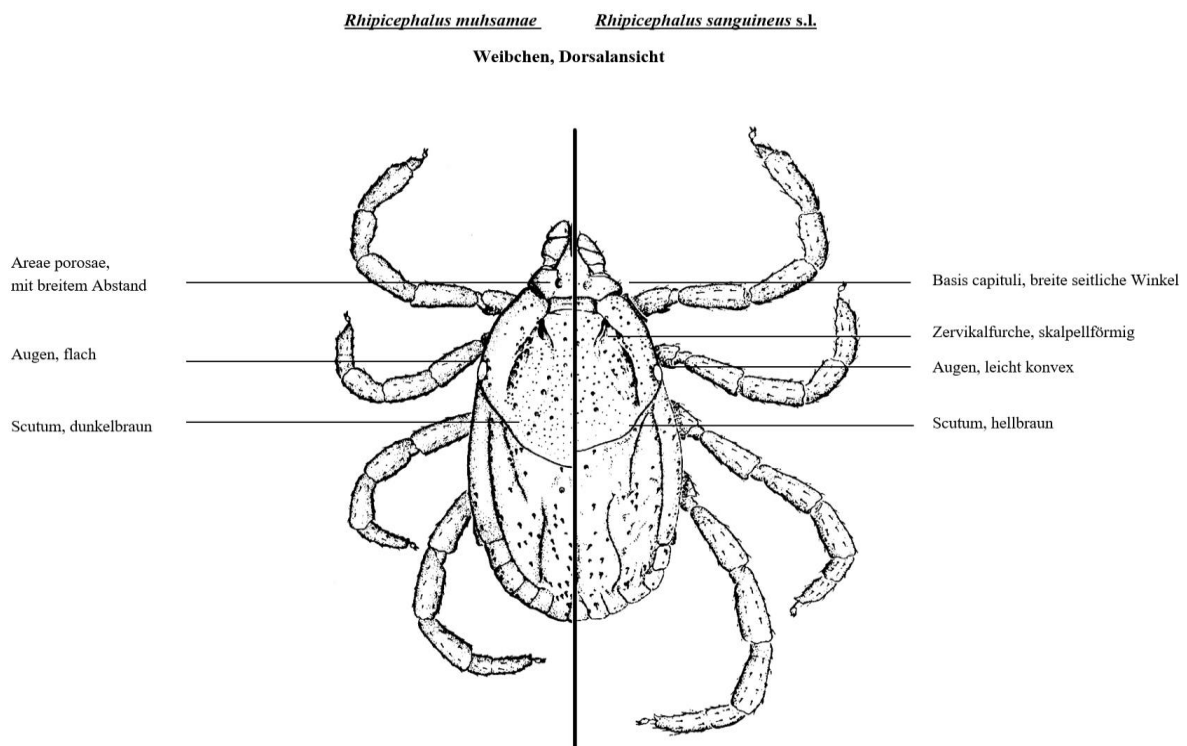


Abb. 2b: Vergleichende Dorsalansicht Weibchen von *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (rechts) und *Rhipicephalus muhsamae* (links), modifiziert nach WALKER et al. (2000).

Das Conscutum der Männchen beginnt schmal und verläuft hinter den leicht gewölbten Augen breiter aus. Wie bei den Weibchen sind die Augen dorsal mit einigen Punktationen umrandet. Die Zervikalgruben sind klein und tief. Die Zervikalfurchen sind kaum bis gar nicht zu erkennen. Die Marginalfurchen sind deutlich sichtbar, punktiert und beginnen hinter den Augen. Nach posterior schließen sie die ersten beiden Festone ein. Die Posteriolateralfurche ist nahezu kreisförmig, die Posteromedianfurche ist länglich und schmal. Typisch sind meist vier Reihen von größeren, deutlichen Punktationen, die individuell in ihrer Intensität verschieden gut zu erkennen sind. Die ventral liegenden, verlängerten Stigmenplatten sind von dorsal sichtbar. Der Adanalschild hat eine annähernd dreieckige Form mit einer breiten, teilweise abgerundeten Basis posterior. Auch der akzessorische Analschild ist deutlich erkennbar (s. **Abb. 4**).

Bis zur Klärung des taxonomischen Status der *R. sanguineus* Zecken gelten alle morphologischen Beschreibungen unter Vorbehalt. Außerdem ist zu beachten, dass es auch innerhalb einer Art morphologische Unterschiede gibt (HOOGSTRAAL 1956). Dieser Aspekt, sowie zahlreiche unterschiedliche Beschreibungen der mutmaßlich gleichen Zeckenart aus verschiedenen Ländern und Kontinenten, macht eine richtige Beschreibung zum jetzigen Zeitpunkt fast unmöglich (NAVA et al. 2015).

Rhipicephalus muhsamae

Rhipicephalus sanguineus s.l.

Weibchen, Ventralansicht Genitalapparat

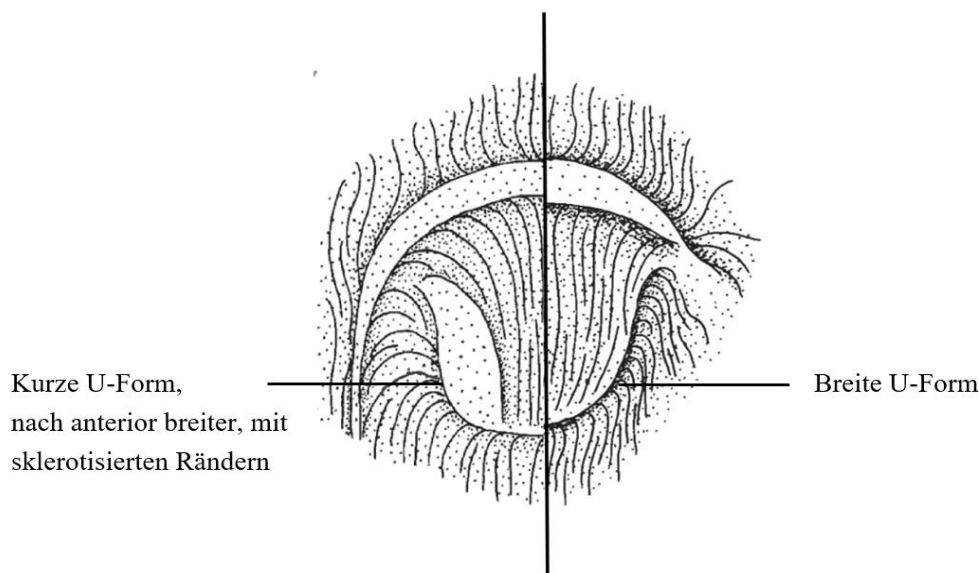


Abb. 3: Vergleichende Ventralansicht des Genitalapparats der Weibchen von *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (rechts) und *Rhipicephalus muhsamae* (links), modifiziert nach WALKER et al. (2003).

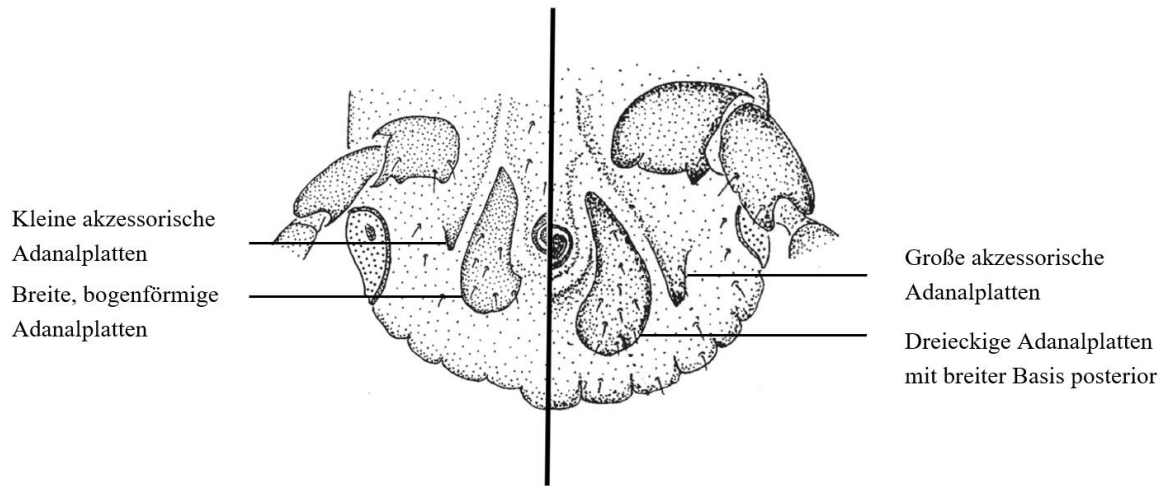
*Rhipicephalus muhsamae**Rhipicephalus sanguineus* s.l.**Männchen, Ventralansicht Genitalapparat**

Abb. 4: Vergleichende Ventralansicht des Genitalapparats der Männchen von *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (rechts) und *Rhipicephalus muhsamae* (links), modifiziert nach WALKER et al. (2003).

2.1.3.1.2 Entwicklungszyklus und Wirte

Rhipicephalus sanguineus sensu lato ist eine drei-wirtige, monotrope Zecke und parasitiert vorzugsweise auf Hunden, seltener auch auf anderen Säugetieren, einschließlich des Menschen (GODDARD 1989, DANTAS-TORRES 2010, ECKERT 2005) (s. **Abb. 5**). RHODES und NORMENT (1979) fanden parasitierende *R. sanguineus* s.l. in geringer Anzahl auch auf Ratten und Mäusen. Die Wirtsfindung erfolgt nach der "Jäger"-Strategie, das heißt die Zecken sind aktiv auf der Suche nach ihrem Wirtstier. *Rhipicephalus sanguineus* s.l. beherrschen aber ebenso die "Wegelagerer"-Taktik (DANTAS-TORRES 2010). Bevorzugte Körperlokalisationen für den Saugakt sind der Kopf, insbesondere die Ohren, die Zwischenzehenbereiche, der Rücken, die Leiste und die Achseln (KOCH 1982, LORUSSO et al. 2010, DANTAS-TORRES 2010). Die Weibchen nehmen dabei bis zu 0,5 ml Blut auf, männliche Adulti dagegen multiple kleine Blutmahlzeiten. LITTLE et al. (2007) konnten in einer Studie belegen, dass die Männchen in der Lage sind zwischen zwei im selben Haus/Zwinger lebenden Hunden den Wirt zu wechseln. Die Kopulation findet auf dem Wirtstier statt. Nach einer Blutmahlzeit von bis zu drei Wochen legt das Weibchen an einer geschützten Brutstätte, zwischen Felsspalten oder Steinen in der Umgebung, bis zu 5000 Eier (WALKER et al. 2000, DANTAS-TORRES 2008). Die Gelegegröße ist abhängig von der Größe des Weibchens, der aufgenommenen Blutmenge und der Zeit, die sie ungestört zur Eiablage zur Verfügung hat (SRIVASTAVA und VARMA 1964, KOCH 1982). Die sechsbeinigen Larven schlüpfen nach einer Zeit von drei bis vier Wochen (BOCH et al.

2006). Nach ca. 17-30 Tagen vollziehen die Larven einen Saugakt von zwei bis sechs Tagen bis zur nächsten Häutung außerhalb des Wirtstieres. Die daraus hervorgehende Nymphe saugt wiederum vier bis neun Tage bis das finale Entwicklungsstadium der adulten Zecke nach erneuter Häutung erreicht ist. Bei optimalen Bedingungen kann ein vollständiger Entwicklungszyklus innerhalb von drei Monaten abgeschlossen werden. Ein vollständiger Entwicklungszyklus von 65-90 Tagen konnte unter optimalen Laborbedingungen bei 29 °C von SRIVASTAVA und VARMA (1964) nachgewiesen werden. Üblich ist jedoch ein Zeitraum von bis zu einem Jahr. Bei Umgebungstemperaturen unter 20 °C sistiert die Entwicklung von *R. sanguineus* in einem Ruhezustand, der sogenannten Diapause. Adulti ist es möglich eine Hungerperiode von bis zu 19 Monaten zu überbrücken, Larven und Nymphen überdauern neun bzw. sechs Monate ohne Wirtstierkontakt (ECKERT 2005, TAYLOR et al. 2007). *Rhipicephalus sanguineus* s.l. ist die einzig bekannte Schildzecke, die sich in geschlossenen Räumen wie beispielsweise Tierheimen, Zwingern und Wohnungen fortpflanzen kann (LUCIUS und LOOS-FRANK 2008). Dort kann sie ganzjährig aktiv sein. In Gebieten südlich der Alpen ist die Hauptaktivitätszeit zwischen März und Oktober (BOCH et al. 2006).

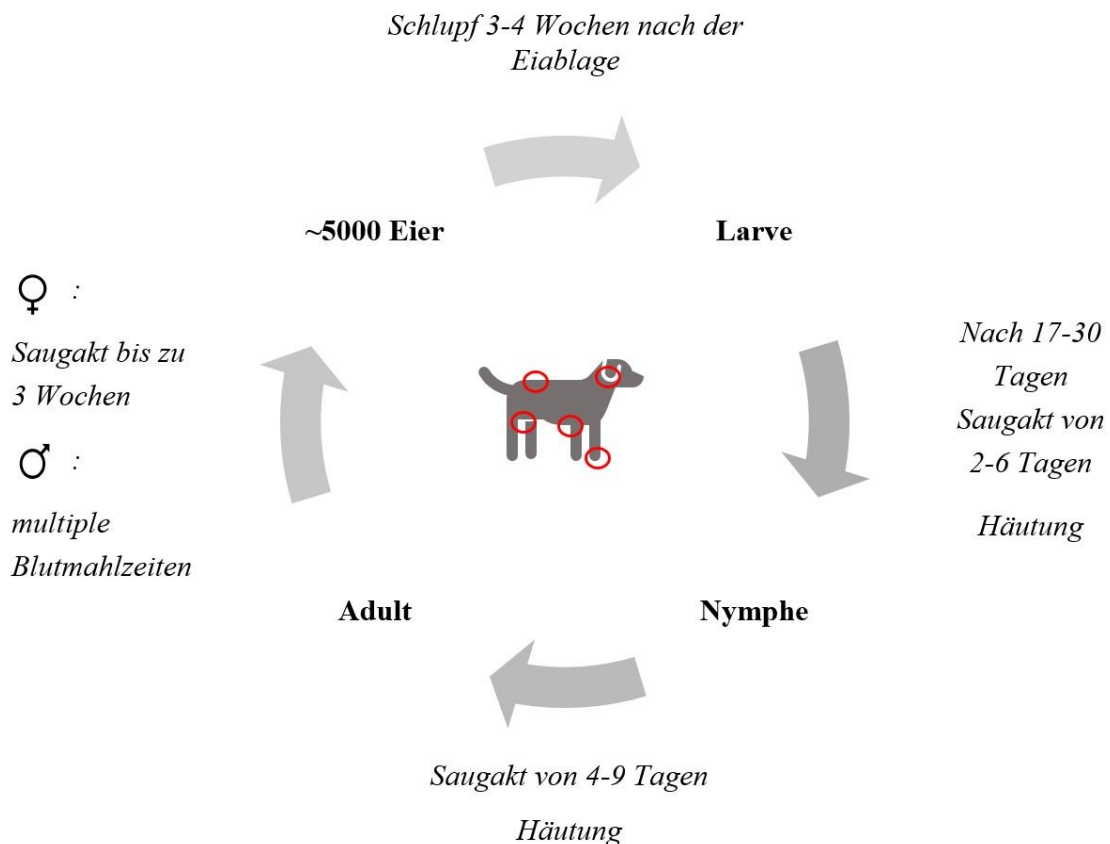


Abb. 5: Lebenszyklus *Rhipicephalus sanguineus* s.l.

2.1.3.1.3 Verbreitung und Habitat

Laut WALKER et al. (2000) und HOOGSTRAAL (1956) ursprünglich in Afrika beheimatet, gilt *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato heute als die weltweit meist verbreitete Zeckenart. Endemisch ist diese Art beinahe in jedem Land zwischen 50° nördlicher und 35° südlicher Breite über die gesamten Tropen, Subtropen und die gemäßigteren Zonen, inklusive der Mittelmeerregion. Wissenschaftlich korrekt hat *Rhipicephalus sanguineus* s.s. seinen Ursprung laut LATREILLE (1806) in „Gallia“, was geografisch dem heutigen Frankreich entsprechen müsste. Wie bereits in Kapitel 2.1.3.1.1 beschrieben, kann zum jetzigen Zeitpunkt kein Konsens gefunden werden, welcher Ursprung der Wahrscheinlichste ist. Die Entscheidung von WALKER et al. (2000) Afrika als ursprünglichen Kontinent festzulegen, begründet sich vermutlich auf der Tatsache, dass das Genus *Rhipicephalus* hauptsächlich auf diesem Kontinent vertreten ist (DANTAS-TORRES 2008). MOREL und VASSILIADES (1962) sehen den Ursprung von *R. sanguineus* im mediterranen Raum.

Die Adaption an den Hund als Hauptwirt und dessen Domestikation hat eine weite geografische Ausbreitung maßgeblich gefördert (ECKERT 2005). Zunehmende Reisen mit Hunden in südeuropäische Länder und die Verbringung von dort lebenden Wirtstieren haben zur Verschleppung dieser Zecke auch weit nach Nordeuropa beigetragen. Nördlich der Alpen, wo die Entwicklung aufgrund des gemäßigten Klimas mit Temperaturen unter 20 °C im Freien nicht mehr möglich ist, kann diese Zeckenart sich in stabilen Temperaturbereichen in Innenräumen, wie Zwingern und Wohnungen weiterhin vermehren. Damit verbunden sind einzelne autochtone Herde in urbanen Gebieten Europas (ECKERT 2005).

Erste Funde von *R. sanguineus* s.l. in Deutschland wurden schon im Jahr 1944 beschrieben (ZUMPT 1944). Hauptverbreitungsgebiete lagen in einer Studie aus dem Jahr 1973 im Raum Oberhessen und Heidelberg (GOTHE und HAMEL 1973). Insgesamt ist von einer noch geringen Anzahl an *R. sanguineus* s.l. in Deutschland auszugehen. 1995 konnten *R. sanguineus* s.l. Zecken auf 22 Hunden dokumentiert werden, von denen jedoch die meisten vermutlich mit einem vorangegangenen Auslandsaufenthalt in Zusammenhang standen (DONGUS et al. 1996). Von 1728 untersuchten Zecken im Raum Berlin/ Brandenburg, die von Hunden abgesammelt wurden, war nur eine weibliche *R. sanguineus* s.l. (BECK et al. 2014).

JAENSON et al. (1994) beschrieben einzelne Populationen bis in die skandinavischen Länder, wie Schweden und Norwegen. Ebenfalls beschrieben wurde *R. sanguineus* s.l. in einem Haus in London (FOX und SYKES 1985). Eine aktuelle Veröffentlichung spricht von 40 dokumentierten Fällen der Eintragung von *R. sanguineus* s.l. nach Großbritannien seit 2012 (HANSFORD et al. 2017). In fernöstlichen Ländern ist sie sowohl in Thailand (NITHIKATHKUL et al. 2005, CHANGBUNJONG et al. 2009) als auch in China (LIU et al. 2013) die am häufigsten auf Hunden parasitierende Zeckenart. IWAKAMI et al. (2014) beschreiben das Vorkommen von *R. sanguineus* s.l. auf Hunden und wenigen Katzen in einer landesweiten Studie in Japan von 2011. In Australien wurde *R. sanguineus* s.l. ebenso wie in

Nordamerika mehrfach beschrieben (ROBERTS 1965, RHODES und NORMENT 1979, KOCH 1982, GREAY et al. 2016).

2.1.3.1.4 *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato als Vektor

Hunde, als Hauptwirt der braunen Hundezecke, können sich mit verschiedenen Erregern infizieren. Übertragen werden Protozoen, wie *Babesia vogeli*, *B. canis*, *B. gibsoni* als Erreger der kaninen Babesiose und *Hepatozoon canis*, welcher eine orale Aufnahme der infizierten Zecke zur Infektion erfordert (WALKER et al. 2003, UILENBERG 2006, CHAO et al. 2017). Bisher konnte nur eine transstadiale und keine transovarielle Übertragung von *Hepatozoon canis* innerhalb der Zeckenpopulation nachgewiesen werden (BANETH et al. 2001). Der Lebenszyklus von *Hepatozoon canis* in *R. sanguineus* sensu lato und dem Hund konnte vollständig beschrieben werden (BANETH et al. 2007). Das durch *R. sanguineus* s.l. übertragene intrazelluläre Bakterium *Ehrlichia canis* verursacht die kanine monozytäre Ehrlichiose, welche akut bis chronische Verläufe nehmen kann und meist unspezifische Symptome wie hohes Fieber, Lethargie, Lymphadenomegalie und Blutungen auslöst (WALKER et al. 2003, HARRUS und WANER 2011). Ebenfalls nachgewiesen wurde *Anaplasma platys*. Diese intrazellulären Bakterien verursachen die kanine zyklische Thrombozytopenie (RAMOS et al. 2014, OSCHEROV 2011).

Auch wenn *Rhipicephalus sanguineus* s.l. eine vergleichsweise niedrige Affinität zum Menschen haben, übertragen sie eine Vielzahl an Erregern mit zoonotischem Potenzial und sind an deren Verbreitung maßgeblich beteiligt. So wird beispielsweise vermutet, dass die Bedeutung dieser Zeckenart bei der Übertragung des Q-Fiebers durch *Coxiella burnetii*, vor allem in der Verbreitung durch hohe Konzentrationen des Erregers in den Fäzes der Zecken liegt (PAROLA und RAOULT 2001, BERNASCONI et al. 2002). *Rickettsia conorii* und *Rickettsia rickettsii* werden direkt durch den Stich einer infizierten *R. sanguineus* s.l. Zecke auf den Menschen übertragen (PAROLA und RAOULT 2001, DEMMA et al. 2005). PIRANDA et al. (2011) konnten sowohl eine transstadiale als auch transovarielle Übertragung von *Rickettsia rickettsii* auf *R. sanguineus* s.l. nach dem Saugen an Hunden feststellen, welche zuvor unter Laborbedingungen infiziert wurden. Klinisch äußert sich eine Infektion mit *Rickettsia conorii* als Mittelmeer-Fleckfieber (auch Boutonneuse Fever oder engl. mediterranean spotted fever) mit hohem Fieber und Abgeschlagenheit, sowie eines typischen Eschar an der Stichstelle (DOBLER und WÖLFEL 2009). *Rickettsia rickettsii* ist der Erreger des Rocky Mountain Zeckenbissfiebers (engl. rocky mountain spotted fever), welches wesentlich schwerer bis letal verlaufen kann (DANTAS-TORRES 2007, RAOULT und ROUX 1997). Auch *Rickettsia massiliae* wurde in *R. sanguineus* s.l. nachgewiesen (EREMEEVA et al. 2006, PAROLA et al 2013, CICUTTIN et al. 2014).

Des Weiteren wird die Rolle von *R. sanguineus* s.l. bei der Übertragung von *Leishmania infantum* diskutiert (COUTINHO et al. 2005, DANTAS-TORRES 2010). Dabei wurden in

vorrangig männlichen Zecken dieser Art *Leishmania infantum* k-DNA Genprodukte detektiert (SOLANO-GALLEGO et al. 2012).

Candidatus Neoehrlichia mikurensis wurde in einer Studie von 2013 in *R. sanguineus* s.l. Zecken aus Nigeria via PCR das erste Mal in Afrika nachgewiesen (KAMANI et al. 2013).

R. sanguineus s.l. gilt außerdem als Zwischenwirt von *Cercopithifilaria* spp., insbesondere *Cercopithifilaria bainaie*. Diese Filarien sind in der Lage sich in der braunen Hundezecke bis zur infektiösen Larve III zu entwickeln (BRIANTI et al. 2012, RAMOS et al. 2013). Als Ursache der kutanen Mikrofilariose des Hundes ist diese Art bisher wenig untersucht, obwohl Studien bereits von einer durchschnittlichen Prävalenz im Mittelmeerraum anhand von PCR-Untersuchungen von Hautbiopsaten von 10,5% ausgehen. Hautproben von spanischen Hunden zeigten sogar eine Prävalenz von 45,5% (OTRANTO et al. 2012). In einer Studie von LATROFA et al. (2014) waren *Cercopithifilaria* spp. die am meisten detektierten Pathogene in *R. sanguineus* s.l..

2.1.3.2 *Rhipicephalus muhsamae*

2.1.3.2.1 Taxonomie und Morphologie

Rhipicephalus muhsamae MOREL & VASSILIADES, 1965 zählt ebenfalls zur Unterfamilie der Rhipicephalinae in der Familie der Ixodidae. Namensgeber ist Frau Dr. Brouria Feldman-Muhsam (Department of Parasitology, Hebrew University, Jerusalem). Zusammen mit *Rhipicephalus simus* und *Rhipicephalus praetextatus* bildet sie die sogenannte Simus-Gruppe im Genus *Rhipicephalus*. Zum jetzigen Zeitpunkt liegen wenige Studien zu dieser Zeckenart vor, so dass sich alle Informationen auf relativ wenige Quellen beschränken.

Die großen fast schwarzen Zecken werden nach WALKER et al. (2000) und WALKER et al. (2003) wie folgt beschrieben (s. **Abb. 2a/b**):

Das Scutum der Weibchen ist von dunkelbrauner Farbe, länger als breit und mit leicht kurvigem hinterem Rand. Die flachen Augen liegen vor dem breitesten Teil des Scutums. Zwischen den Areae porosae ist ein weiter Abstand. Die Zervikalgruben sind breit und interstitiell nur spärlich punktuert. Der Genitalapparat hat die Form eines schmalen kurzen U's, welches sich nach anterior verbreitert und deutliche sklerotisierte Ränder formt (s. **Abb. 3**).

Die Männchen besitzen ein ebenfalls länger als breites, dunkles Conscutum mit nur kleinen Punktationen. Die Adanalplatten sind breit, bogenförmig und leicht gewölbt, der innere Rand posterior des Anus. Die akzessorischen Adanalplatten hingegen nur klein und gepunktet (s. **Abb. 4**). Deutliche Punktationen sind an den ausgeprägten Lateralfurten sichtbar.

Da die drei Zeckenarten der "Simus"-Gruppe morphologisch sehr ähnlich sind, ist auf einige Charakteristika zu achten. Im Gegensatz zu den männlichen *R. muhsamae* sind die

Adanalplatten von *R. simus* sichelförmig und sehr groß, ebenso wie die akzessorischen Adanalplatten, welche deutlich gepunktet und sklerotisiert sind. *Rhipicephalus praetextatus* besitzt ebenfalls breite Adanalplatten, jedoch mit leicht gewölbtem innerem und hinterem Rand; die akzessorischen Adanalplatten sind ebenfalls sklerotisiert. Die Lateralfurchen von *R. muhsamae* erreichen zwei Festone, bei *R. simus* jeweils einen Feston. Im Falle von *R. praetextatus* werden sie nach anterior von Punktuationen verlängert.

Die Weibchen von *R. simus* und *R. praetextatus* haben im Gegensatz zu *R. muhsamae* ein geringfügig breiter als längeres Scutum. Der kaudale Rand ist bei *R. simus* rund geformt. *Rhipicephalus praetextatus* hat ein glattes, glänzendes Schild. Der U-förmige Genitalapparat zeichnet sich durch Unterschiede des sklerotisierten Randes aus. So ist er bei *R. simus* nur schmal sklerotisiert verlaufend, während er bei *R. praetextatus* nicht sklerotisiert ist.

2.1.3.2.2 Entwicklungszyklus und Wirte

Rhipicephalus muhsamae ist eine drei-wirtige Zecke. Hauptwirt der adulten Zecken sind Rinder. Als bevorzugte Körperlokalisationen gelten die Ohren, die Nacken- und Genitalregion sowie die distalen Gliedmaßen. Weniger häufig ist das Parasitieren auf kleinen Wiederkäuern, Hunden und Warzenschweinen (WALKER et al. 2000). Auch auf Kamelen konnten Adulti nachgewiesen werden (DIOLI und FOX 2004). Larven und Nymphen saugen bevorzugt auf Nagetieren. Die Stadien sind ganzjährig zu finden (WALKER et al. 2003).

2.1.3.2.3 Verbreitung und Habitat

Das bisher beschriebene Verbreitungsgebiet von *Rhipicephalus muhsamae* nach WALKER et al. (2003) liegt in West- und Zentralafrika zwischen 0° und 18 ° nördlicher Breite in Savannenklima und einem Jahresniederschlag bis zu 1500 mm/m² (PEGRAM et al. 1981). In westlichster Ausbreitung sind Individuen in Guinea-Bissau (TERENIUS et al. 2000), im Senegal (WALKER et al. 2000) und Mali (TEEL et al. 1988) beschrieben, weiter ostwärts bis nach Kenia (DIOLI und FOX 2004) und Äthiopien (PEGRAM et al. 1981). Beschreibungen zur Verbreitung von *R. muhsamae* im Sudan existieren aus dem Jahr 1980 (MOREL 1980) von WALKER et al. (2000) und in einer aktuelleren Studie von 2012 (ELGHALI und HASSAN 2012). Auf der Grundlage unpublizierter Daten wurde *R. muhsamae* in Ägypten in einer Studie von 1987 erwähnt (PEGRAM et al 1987c).

2.1.3.2.4 *Rhipicephalus muhsamae* als Vektor

Über die Vektorkompetenz von *Rhipicephalus muhsamae* liegen nur wenige Daten vor. Im Jahr 1994 wurden in der Zentralafrikanischen Republik Gensequenzen des 190-kDa Antigens von *Rickettsia conorii* und *Rickettsia massiliae* in *R. muhsamae* beschrieben (DUPONT et al. 1994). In einer jüngeren Arbeit wurde *Rickettsia massiliae* in zwei von 37 *R. muhsamae* Zecken aus Mali nachgewiesen (PAROLA et al. 2001).

Ein bisher unbekannter 16S rRNA Genotyp von *Ehrlichia* (Acc.No.AF311965, ERm58, 1380 bp) befand sich in sieben von 37 *R. muhsamae* aus Mali. Anhand phylogenetischer Analysen konnte dieser Genotyp mit hoher Wahrscheinlichkeit der *Ehrlichia canis*-Gruppe zugeordnet werden (PAROLA et al. 2001).

MOREL (1980) zitierte TENDEIRO (1952) bezüglich einer möglichen Infektion mit *Coxiella burnetii* (WALKER et al. 2000).

Eine einzige Erwähnung als Vektor des Koutango Virus (Genus *Flavivirus*, Familie *Flaviviridae*) in der Zentralafrikanischen Republik findet *R. muhsamae* im Jahresbericht 1986 des Institut Pasteur in Dakar im Senegal. Klinische Anzeichen einer Infektion sind Fieber, Arthralgie und ein Hautausschlag (CDC 1984).

3 PUBLIKATIONEN

3.1 Stellungnahme zum Eigenanteil an den Arbeiten zur Publikation

“The presence of *Rhipicephalus muhsamae* north of the Sahara”

Langguth J, Chitima-Dobler L, Nava S, Pfeffer M. Ticks and Tick-borne Diseases 2017, 8 (4): 605-609.

An der Konzeption des Themas war mein Betreuer Prof. Dr. Martin Pfeffer maßgeblich beteiligt.

Die Literaturrecherche und Zusammenfassung wurden eigenständig verfasst.

Die im Material- und Methodenteil erwähnten Untersuchungen (Sammlung, morphologische Bestimmung der Zecken, DNA-Extraktion sowie PCR-Untersuchungen) habe ich selbstständig durchgeführt.

Die Auswertung und Bewertung der Daten aller Zecken im Ergebnisteil erfolgten ebenfalls selbstständig und ohne Hilfestellung. Herr Santiago Nava erstellte die phylogenetischen Analysen.

Bei der Diskussion und Revision des Manuskripts erhielt ich Hilfe von den anderen Coautoren.

Leipzig, 18.12.2017

Johanna M. Langguth

3.1.1 Publikation 1

Ticks and Tick-borne Diseases 8 (2017) 605–609



Contents lists available at ScienceDirect

Ticks and Tick-borne Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ttbd



Short communication

The presence of *Rhipicephalus muhsamae* north of the Sahara

Johanna Langguth^a, Lidia Chitimia-Dobler^{b,c}, Santiago Nava^d, Martin Pfeffer^{a,*}



^a Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Veterinary Faculty, University of Leipzig, Germany

^b Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich, Germany

^c German Center of Infection Research (DZIF) Partner, Munich, Germany

^d Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Santa Fe, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

Rhipicephalus muhsamae
Egypt
Distribution
Morphology
16S rRNA

ABSTRACT

The occurrence of male and female *Rhipicephalus muhsamae* feeding on dogs and a horse in Upper Egypt is described. The morphological identification was verified using partial 16S rRNA gene sequences. By applying respective real-time PCRs, no evidence neither for *Coxiella burnetii* nor for spotted-fever rickettsia infections were found in the ticks.

1. Introduction

Rhipicephalus muhsamae Morel and Vassiliades, 1965, is known as a typical cattle tick common in West and Central Africa. The distribution extends from Senegal to Ethiopia and southwards into Burundi, and thus occurs between the equator and the 18° latitude N across the continent (Pegram et al., 1981, 1987; Walker et al., 2000, 2003; Jongejan et al., 2004). Together with *Rhipicephalus simus* and *Rhipicephalus praetextatus*, it forms the so-called “simus” group (Pegram et al., 1987; Walker et al., 2003). There are still discussions regarding the distribution of the three species forming the *R. simus* group and the re-examination of old collection is always recommended (Walker et al., 2000). *Rhipicephalus muhsamae* is a three-host tick. Adults are usually found on cattle, and less often and with lower abundance attached on dogs, small ruminants, wild carnivores and warthogs (Walker et al., 2000), while the immature stages are known to prefer rodents as hosts (Walker et al., 2003). Dioli and Fox (2004) detected adults on a one-humped camel in East Africa. There is yet no proven evidence for *R. muhsamae* to be a vector of known pathogens. However, a possible infection with *Coxiella burnetii* was noted by Morel (1980) and Walker et al. (2000). Our study investigated ticks collected from horses and dogs in a veterinary clinic in Luxor, Egypt, and it confirmed the presence of *R. muhsamae* in Egypt. The ticks were also tested for *Rickettsia* spp. and *Coxiella burnetii*.

2. Material and methods

A total of 1030 ticks were removed from various animal species (dog, horse, donkey, cat, camel) at a veterinary clinic in Luxor, Egypt, from May 2013 to July 2013 (Langguth, unpublished data). Data on the number of *R. muhsamae* ticks collected from animals, life stage and other tick species present on these hosts together with their breed, age, gender, reason for the visit to the veterinary clinic are given in Table 1.

The ticks were collected and transported in plastic tubes to Germany, where they were stored at –80 °C until further processing.

The ticks were identified using morphological characters according to Walker et al. (2000, 2003). For photo documentation, a Keyence VHX-900 F microscope with a tiltable stand with upper light together with polarized light for focus stacking was used.

Total nucleic acid was extracted from individual ticks using the MagNApure LC RNA/DNA Kit (Roche, Mannheim, Germany) in a MagNA Pure LC instrument (Roche) according to the instructions of the manufacturer. The extracted total nucleic acid was stored at –80 °C until use.

The 16S rRNA gene was amplified using a previously described polymerase chain reaction (PCR) protocol (Mangold et al., 1998). The obtained 420 bp fragment was analyzed by gel electrophoresis and Sanger sequencing (GATC Biotech, Konstanz, Germany). The phylogenetic analysis based on partial 16S rRNA gene sequence, was performed with Maximum-likelihood (ML) method using Mega5.0 (Tamura et al., 2011). Best fitting substitution models were determined with the Akaike Information Criterion using the ML model test implemented in

* Corresponding author at: Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, D-04103 Leipzig, Germany.
E-mail address: pfeffer@vetmed.uni-leipzig.de (M. Pfeffer).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.04.004>

Received 14 November 2016; Received in revised form 3 April 2017; Accepted 5 April 2017

Available online 07 April 2017

1877-959X/ © 2017 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Table 1
Rhipicephalus muhsamae collected from animals in Luxor, Egypt, in 2013.

Animal, breed (sex/age) ^a	Location on the animal	Sampling dates	Number of <i>R. muhsamae</i>		Other ticks present ^c	Reason for visit in hospital
			female	male		
Dog, mixed breed (f/1)	ear	28 May 2013	1		<i>R. sanguineus</i> s.l. (1 f)	injury (foot)
Dog, German Shepherd-Mix (m/1)	throat	08 Jun 2013	1			healthy
Dog, mixed breed (m/2 month)	shoulder, toes	09 Jun 2013		1	<i>R. sanguineus</i> s.l. (4 f, 4 m)	healthy
Horse, warmblood (m/n.k.)	neck, throat, tail	27 Jun 2013	6	12	<i>Hyalomma anatolicum</i> (1 f)	tick treatment, alopecia
Dog, German Shepherd-Mix (m/1) ^b	eye, ear	27 Jun 2013	1	1		healthy
	chest	30 Jun 2013	1	1		
Dog, mixed breed (f/3)	belly	11 Jul 2013	2	1		healthy

^aAge in years; n.k., not known; f, female; m, male.

^bplease note the different locations on and sampling date of the same dog.

^cf, female; m, male.

MEGA 5.0. Support for the topologies was tested by bootstrapping over 1000 replicates and gaps were excluded from the comparisons. The substitution model was GTR + G. 16S rRNA gene sequences of *Rhipicephalus* spp. available in the GenBank were included in the sequences comparison. Finally, the ticks were tested for *Rickettsia* DNA using a panRickettsia real-time PCR (Wölfel et al., 2008) and *Coxiella burnetii*-specific real-time PCR (Frangoulidis et al., 2012).

3. Results

In total, 1030 ticks were collected from 75 animals. Twenty-eight ticks collected from 5 dogs and one horse were morphologically identified (Walker et al., 2000, 2003) as *R. muhsamae* and confirmed using partial 16S rRNA gene sequencing (Mangold et al., 1998). Further ticks were identified as *R. sanguineus* s.l. (n = 881), *R. annulatus*

(n = 102), *Hyalomma anatolicum* (n = 15), and *Haemaphysalis* spp. (n = 4; Langguth, unpublished data). The 5 dogs mainly came for tick treatment and were in good general condition (Table 1). Only one dog came due to an injury. The ticks were collected mainly from the front part of the body (neck, ear, shoulder, and chest) and from one dog from the belly. The *R. muhsamae* ticks on the horse were found at the neck and the tail at locations with alopecia. A total of 16 males and 12 females were found (Table 1). Morphological identification was based on the identification keys by Walker et al. (2000, 2003): Female: scutum was dark brown, longer than broad with the posterior margin somewhat sinuous. The eyes were flat and located anterior to the broadest part of the scutum. The separation of the porose areas was wide. The cervical fields had a broad shape and the interstitial punctation size was tiny with a sparse distribution. The genital aperture was narrow truncated U-shape and diverging markedly anteriorly with



Fig. 1. *Rhipicephalus muhsamae* female: (A) ventral general view (50×); (B) dorsal general view (50×); (C) capitulum dorsal and scutum (150×); (D) capitulum ventral and genital aperture (150×).



Fig. 2. *Rhipicephalus muhsamae* male: (A) dorsal general view (50 $\times$); (B) ventral general view (50 $\times$); (C) adanal plates (150 $\times$); (D) coxae and capitulum ventral (150 $\times$).

wide and distinct sclerotized margins (Fig. 1). Male: had a dark conscutum, longer as broad, with a minute punctuation size. The adanal plates are broad and curved, with the internal margins posterior the anus and slightly concave, the accessory adanal plates were small and pointed. The lateral grooves were distinct with marked punctuations (Fig. 2).

There are only marginal characteristics to differentiate *R. muhsamae* adults from the other *simus* group members, *R. praetextatus* and *R. simus*. The *R. muhsamae* male adanal plates are broad and curved, with the internal margins posterior the anus and slightly concave; the accessory adanal plates were small and pointed. *R. simus* male has large, robust, and almost sickle-shaped adanal plates; the accessory adanal plates are large, pointed and well sclerotized. *R. praetextatus* male has broad adanal plates with the inner margins slightly concave and the posterior margins smoothly rounded; the accessory adanal plates are pointed and well sclerotized. Marginal lines are long, enclosing two festoons posteriorly on *R. muhsamae*, while only one festoon on *R. simus* and continued anteriorly by a few medium-sized setiferous punctuations on *R. praetextatus* (Pegram et al., 1987; Walker et al., 2000).

The females of the “*simus*” group can be differentiated by some features on the dorsal and ventral view. On the dorsal view: the eyes are located just anterior the broadest part of the scutum, almost flat and edged dorsal by a few medium-sized setiferous punctuations on *R. muhsamae*; at the broadest part of scutum, anterior to mid-length, almost flat and edged dorsally by a few large setiferous punctuations in faint depressions on *R. simus*; at mid-length, almost flat and edged dorsally by a few medium-sized setiferous punctuations on *R. praetextatus*. Scutum can be also considered for a differential diagnostic: it is longer than broad and the posterior margin somewhat sinuous on *R. muhsamae*; slightly broader than long and the posterior margin usually rounded on *R. simus*; slightly broader than long and almost flat and glossy on *R. praetextatus*.

The female genital aperture is in each case a truncated U- shape, while the sclerotized margins are different: wide and distinct sclerotized margins on *R. muhsamae*; narrow sclerotized margins on *R. simus*, and sclerotized margins absent on *R. praetextatus* (Pegram et al., 1987; Walker et al., 2000).

When compared to the female genital aperture of *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (this comparison is based on the description of *R. sanguineus* s.l. of Walker et al. (2000)), posterior lips had a truncated V-shape. Accessory adanal plates of *R. muhsamae* are larger than in *R. sanguineus* s.l. males. The setiferous punctuations are distinct in females and males, and showed the typically “*simus*” pattern with four uneven columns passed the scutum or rather the conscutum.

The obtained 16S rRNA gene sequences formed four different haplotypes of 16S rRNA gene sequences of *R. muhsamae* from Egypt (see Fig. 3, Acc.-No.: KY111455-KY111470). All four were included in the phylogenetic analyses and compared with sequences of *R. muhsamae* from Nigeria and Ivory Coast (sequence from Nigeria is available in GenBank while sequence of *R. muhsamae* from Ivory Coast was obtained from one specimen determined by one of us (LCD)). All of them clustered together in the same clade with a high bootstrap support (96%) (Fig. 3). The genetic divergence between the 16S rRNA gene sequences of *R. muhsamae* from Ivory Coast, Egypt and Nigeria ranged between 0 and 1.3%. In the phylogenetic tree, the clade formed by all sequences of *R. muhsamae* was more closely related to *R. simus* than to any other *Rhipicephalus* species. The genetic divergence between *R. muhsamae* and *R. simus* ranged from 5.0% to 5.2%.

The tests performed to detect nucleic acids of possible human and veterinarian pathogens like spotted-fever group rickettsiae or *Coxiella burnetii* revealed negative results for all 28 individuals.

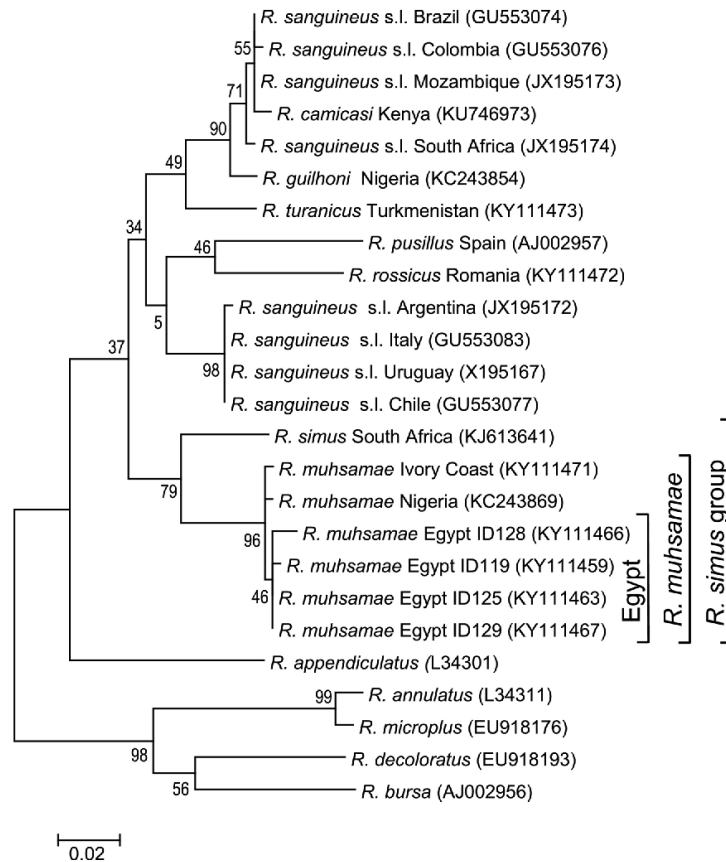


Fig. 3. Phylogenetic tree of partial 16S rRNA gene sequences of representative members of the genus *Rhipicephalus*. The four haplotypes of *R. muhsamae* ticks described in our study cluster together with previously reported *R. muhsamae* from Nigeria and Ivory Coast.

4. Discussion

Our results clearly show that *R. muhsamae* extent its distribution in different directions from the first reports of this species in West and Central Africa. Hoogstraal (1956) did not mention *R. muhsamae* in Sudan as well as Walker (1974) in Kenya. *R. muhsamae* was then described in Nyala, Sudan, in 1980 by Morel (1980) and 20 years later by Walker et al. (2000) and Mohammed and Hassan (2007) on sheep in Sudan. Nevertheless, 30 years later the first specimens of *R. muhsamae* were detected also in Kenya by Dioli and Fox (2004) on a one-humped camel. Other studies refer to *R. simus* in northern Sudan (Salih et al., 2004) or in River Nile Province also in northern Sudan (Ahmed et al., 2005). A recent review reports *R. muhsamae* in Central and Western Sudan (ElGhali and Hassan, 2012) so it seems that the presence of *R. muhsamae* in Sudan is more credible from the different detections as in Kenya where it was found only one time. While in its main distribution in Central Africa, *R. muhsamae* is regarded a typical cattle parasite, we here report this tick species on dogs and a horse. Adamu et al. (2014) found only three specimens, one male and two females, on dogs in Nigeria, even *R. muhsamae* is long known there. Terenius et al. (2000) collected *R. muhsamae* from different animals and also from the vegetation on Guinea-Bissau. This result together with the host list from Walker et al. (2000) suggests that dogs are usually not very often infested with *R. muhsamae*. However, if more attention would be paid on the correct taxonomic allocation of *Rhipicephalus* spp., *R. muhsamae* might be found more frequently on dogs than currently thought. Although the presence of *R. muhsamae* in North Africa has been

confirmed in this work, there is a previous observation of *R. muhsamae* in Egypt mentioned by Clifford as personal comment in Pegram et al. (1987). There has always been an intensive trade (including animals) between the Sudan and Egypt along the Nile River which might be the most likely introduction route. As we found this tick species on various animals over a period of almost three months, we have to consider it to be endemic in the Luxor region in the north of Upper Egypt. This is further supported by similar climatic conditions here when compared to the regions in Central or Western Sudan providing similar living conditions for the ticks.

Conflict of interest

The authors declare no competing personal or financial interests.

Acknowledgements

The technical assistance of Dr. Silke Wölfel, Dr. Mandy Knüpfel, Karolin Guckau, Melanie Nurtsch, Claudia Kahlhofer and Daniela Friese is gratefully acknowledged. The work of Martin Pfeffer was done under the frame of EurNegVec COST Action TD1303.

References

- Adamu, M., Troskie, M., Oshadu, D.O., Malatji, D.P., Penzhorn, B.L., Matjila, P.T., 2014. Occurrence of tick-transmitted pathogens in dogs in Jos, Plateau State, Nigeria. *Parasite Vectors* 7, 119.
- Ahmed, B.M., El-Hussein, A.M., El-Khider, A.O., 2005. Some observations on ticks (Acari:

- Ixodidae) infesting sheep in river Nile province of Northern Sudan. Onderstepoort J. Vet. Res. 72, 239–243.
- Dioli, M., Fox, M.T., 2004. First record of the camel tick *Rhipicephalus muhsamae* in Kenya on a one-humped camel (*Camelus dromedarius*). Vet. Rec. 155, 206–208.
- ElGhali, A., Hassan, S.M., 2012. Ticks infesting animals in the Sudan and southern Sudan: past and current status. Onderstepoort J. Vet. Res. 79 Art. #431.
- Frangoulidis, D., Meyer, H., Kahlhofer, C., Spletstoeser, W.D., 2012. Real-time PCR-based detection of *Coxiella burnetii* using conventional techniques. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 64, 134–136.
- Hoogstraal, H., 1956. African Ixodoidea. I. Ticks of the Sudan (with Special Reference to Equatoria Province and with Preliminary Reviews of the Genera *Boophilus*, *Margaropus*, and *Hyalomma*). US Navy, Washington, D.C 1101 pp.
- Jongejan, F., Nieuwenhuijs, H., Nijhof, A., 2004. Ticks of veterinary and medical importance. Africa. International Consortium on Tick and Tick-borne Diseases (ICTTD-2), CD, 2nd edition 2004.
- Mangold, A.J., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 1998. Mitochondrial 16S rRNA sequences and phylogenetic relationships of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). Parasitol. Res. 84, 478–484.
- Mohammed, M.S., Hassan, S.M., 2007. Distribution and population dynamics of ticks (Acari:Ixodidae) infesting sheep in Sennar State, Sudan. Onderstepoort J. Vet. Res. 74, 301–306.
- Morel, P.C., Vassiliades, G., 1965. Description de *Rhipicephalus muhsamae* n. sp. de l'Ouest Africain (groupe de *Rh. simus*; acariens: Ixodoidea). Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop. 17, 619–636 for 1964 (nouvelle série).
- Morel, P.C., 1980. Study on Ethiopian Ticks (Acarida, Ixodida). Institut d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux.
- Pegram, R.G., Hoogstraal, H., Wassef, H.Y., 1981. Ticks (Acari: Ixodoidea) of Ethiopia. I. Distribution, ecology and host relationships of species infesting livestock. Bull. Entomol. Res. 71, 339–359.
- Pegram, R.G., Walker, J.B., Clifford, C.M., Keirans, J.E., 1987. Comparison of populations of the *Rhipicephalus simus* group: *R. simus*, *R. praetextatus*, and *R. muhsamae* (Acari: Ixodidae). J. Med. Entomol. 24, 666–682.
- Salih, D.A., Hassan, S.M., El Hussein, A.M., Jongejan, F., 2004. Preliminary survey of ticks (Acari: Ixodidae) on cattle in northern Sudan. Onderstepoort J. Vet. Res. 71, 319–326.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28, 2731–2739.
- Terenius, O., Mejlon, H.A., Jaenson, T.G., 2000. New and earlier records of ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) from Guinea-Bissau. J. Med. Entomol. 37, 973–976.
- Wölfel, R., Essbauer, S., Dobler, G., 2008. Diagnostics of tick-borne rickettsioses in Germany: a modern concept for a neglected disease. Int. J. Med. Microbiol. 298 (S1), 368–374.
- Walker, J.B., Keirans, J.E., Horak, I.G., 2000. The Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae): A Guide to the Brown Ticks of the World. Cambridge University Press 643 pp.
- Walker, A.R., Bouattour, A., Camicas, J.L., Estrada-Peña, A., Horak, I.G., Latif, A.A., Pegram, R.G., Preston, P.M., 2003. Ticks of Domestic Animals in Africa: Guide to Identification of Species. ICTTD.
- Walker, J.B., 1974. The Ixodid Ticks of Kenya. A Review of Present Knowledge of Their Hosts and Distribution. CAB, London 220 pp.

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

„Genetic analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks parasites of dogs in Africa north of the Sahara based on mitochondrial DNA sequences“

Chitimia-Dobler L, Langguth J, Pfeffer M, Kattner S, Küpper T, Frieze D, Dobler G, Guglielmone AA, Nava S. Vet Parasitol 2017, 239: 1-6.

An der Konzeption des Themas waren die Coautoren und mein Betreuer Prof. Dr. Martin Pfeffer maßgeblich beteiligt.

Die im Material- und Methodenteil erwähnten Untersuchungen hinsichtlich des Probenmaterials aus Ägypten (Sammlung, morphologische Bestimmung der Zecken, DNA-Extraktion sowie PCR-Untersuchungen) habe ich selbstständig durchgeführt.

Die Auswertung und Bewertung der Daten der ägyptischen Zecken im Ergebnisteil erfolgten selbstständig und ohne Hilfestellung. Herr Santiago Nava erstellte die phylogenetischen Analysen.

Die Diskussion und Revision des Manuskripts erfolgte in Zusammenarbeit mit den anderen Coautoren.

Leipzig, 18.12.2017

Johanna M. Langguth

3.2.1 Publikation 2

Veterinary Parasitology 239 (2017) 1–6



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Research paper

Genetic analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks parasites of dogs in Africa north of the Sahara based on mitochondrial DNA sequencesLidia Chitimia-Dobler^a, Johanna Langguth^b, Martin Pfeffer^b, Simone Kattner^c, Thomas Küpper^c, Daniela Friese^a, Gerhard Dobler^a, Alberto A. Guglielmon^d, Santiago Nava^{d,*}^a Bundeswehr Institute of Microbiology, Neuherbergstrasse 11, D80937 Munich, German Center of Infection Research (DZIF) Partner Munich, Germany^b Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Veterinary Faculty, University of Leipzig, Germany^c Institute of Occupational and Social Medicine, RWTH Aachen University, Aachen, Germany^d Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CC 22, CP 2300, Rafaela, Santa Fe, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

Rhipicephalus sanguineus sensu lato

16S rRNA

12S rRNA

Taxonomic status

Africa

ABSTRACT

The aim of this work was to determine the evolutionary relationship among tick populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato distributed in Africa north of the Sahara and different lineages of *R. sanguineus* s.l. distributed in different regions of Sub-Saharan Africa, America and Europe through the analysis of DNA sequences of two mitochondrial genes. One hundred and thirty six 16S rRNA gene sequences and twenty-seven 12S rRNA gene sequences of *R. sanguineus* s.l. were analyzed. Phylogenetic analyses were performed including different lineages of *R. sanguineus* s.l. from America, Europe and Africa, and species belonging to the *R. sanguineus* group as *Rhipicephalus camicasi*, *Rhipicephalus guilhoni*, *Rhipicephalus sulcatus*, *Rhipicephalus rossicus*, *Rhipicephalus pusillus*, *Rhipicephalus turanicus* and *Rhipicephalus leporis*. At least two different lineages of *R. sanguineus* s.l. are living in sympatry in Africa north of the Sahara. One of these mitochondrial lineages belongs to the same evolutionary entity that *R. sanguineus* s.l. from tropical areas of America, *R. sanguineus* s.l. from Sub-Saharan Africa, *R. camicasi* and *R. guilhoni*. The other mitochondrial lineage of *R. sanguineus* s.l. present in Africa north of the Sahara is phylogenetically associated to *R. sanguineus* s.l. ticks from southeastern Europe (Romania, Turkey and Greece). Both evolutionary entities are clearly different to the evolutionary entity formed by *R. sanguineus* s.l. from western Europe and temperate areas of America. Thus, the name *R. sanguineus* s.s. cannot be assigned to any of the two evolutionary entities present in Africa north of the Sahara. The taxonomic status of these taxa will remain unresolved until new lines of evidence become available to complement the current results based on mitochondrial DNA.

1. Introduction

The *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari: Ixodidae) contains tick species with substantial medical, veterinary and economic importance because they are common parasites of domestic mammals and vectors of different disease agents affecting domestic and wildlife animals and humans. This species group is formed by *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), *Rhipicephalus sulcatus* Neumann, 1908, *Rhipicephalus rossicus* Yakimov and Kohl-Yakimov, 1911, *Rhipicephalus schulzei* Olenov, 1929, *Rhipicephalus pumilio* Schulze, 1935, *Rhipicephalus pusillus* Gil Collado, 1936, *Rhipicephalus turanicus* Pomerantzev, 1940, *Rhipicephalus leporis* Pomerantzev, 1946, *Rhipicephalus guilhoni* Morel and Vassiliades, 1963; *Rhipicephalus moucheti* Morel, 1965, *Rhipicephalus bergeoni* Morel and Balis, 1976 and *Rhipicephalus camicasi* Morel, Mouchet and Rodhain, 1976 (Pegram et al., 1987).¹ Among all these taxa, *R. sanguineus* (Latreille, 1806) (from now on *R. sanguineus* sensu stricto) stands out because it is a parasite of dogs worldwide, a vector of humans and animals pathogens, and a relevant target of the anti-parasitic market. The presence of different lineages within the taxon so-called *R. sanguineus* s.s. with strong biological and genetic divergences has been demonstrated in several studies around the world (Szabó et al., 2005; Burlini et al., 2010; Eremeeva et al., 2011; Moraes-Filho et al., 2011; Levin et al., 2012; Nava et al., 2012; Dantas-Torres et al., 2013; Liu et al., 2013; Hekimoglu et al., 2016; Labruna et al., 2016;

liades, 1963; *Rhipicephalus moucheti* Morel, 1965, *Rhipicephalus bergeoni* Morel and Balis, 1976 and *Rhipicephalus camicasi* Morel, Mouchet and Rodhain, 1976 (Pegram et al., 1987).¹ Among all these taxa, *R. sanguineus* (Latreille, 1806) (from now on *R. sanguineus* sensu stricto) stands out because it is a parasite of dogs worldwide, a vector of humans and animals pathogens, and a relevant target of the anti-parasitic market. The presence of different lineages within the taxon so-called *R. sanguineus* s.s. with strong biological and genetic divergences has been demonstrated in several studies around the world (Szabó et al., 2005; Burlini et al., 2010; Eremeeva et al., 2011; Moraes-Filho et al., 2011; Levin et al., 2012; Nava et al., 2012; Dantas-Torres et al., 2013; Liu et al., 2013; Hekimoglu et al., 2016; Labruna et al., 2016;

* Corresponding author.

E-mail address: nava.santiago@inta.gob.ar (S. Nava).¹ The authorities and years of publication of *R. turanicus*, *R. rossicus* and *R. moucheti* were modified from those published in Pegram et al. (1987) and Walker et al. (2000) following Guglielmon and Nava (2014).<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.012>Received 10 January 2017; Received in revised form 28 March 2017; Accepted 11 April 2017
0304-4017/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Sanches et al., 2016; Zemtsova et al., 2016; Dantas-Torres et al., 2017; Jones et al., 2017). In fact, *R. sanguineus* s.s. is currently recognized as a species complex rather than a single species (Dantas-Torres and Otranto, 2015; Nava et al., 2015). However and in contrast to this view, other studies have found that ticks previously determined as *R. sanguineus* and *R. turanicus* were genetically indistinguishable (Zahler et al., 1997; Beati and Keirans, 2001). All the above mentioned studies and the formal nomenclatural problems related to the original description of *R. sanguineus* s.s. (see a detailed explanation in Nava et al., 2015) have shown that at the current state of knowledge it is not possible to assign the name *R. sanguineus* s.s. to any tick population worldwide nowadays, and the name *R. sanguineus* sensu lato should be used instead of *R. sanguineus* s.s. until a neotype is properly described.

Africa is the paradigmatic continent for *Rhipicephalus* because 75% of the total number of species belonging to this genus are endemic to the Afrotropical Region (Walker et al., 2000; Guglielmone et al., 2014). In view of the lack of an unambiguous morphological definition of *R. sanguineus* s.l. (Nava et al., 2015), which includes populations from Africa, there is an apparent need for the molecular characterization of *R. sanguineus* s.l. from different regions of this continent. Particularly in areas of the African continent north of the Sahara, there is a lack of genetic studies of *R. sanguineus* s.l. to clarify its taxonomic status. In this context, Egypt becomes relevant not only for its location in the continent, but also due to its proximity to certain areas of southeastern Europe and southwestern Asia where species of the *R. sanguineus* group also coexist. Therefore, this study based on mitochondrial DNA sequences was performed to determine the evolutionary relationship among *R. sanguineus* s.l. from Egypt (considered as a geographical point representative of an African area north of the Sahara) and different lineages of *R. sanguineus* s.l. distributed in different regions of Sub-Saharan Africa, America and Europe, with the main objective of adding information that helps to understand the alpha and beta taxonomy of this group of ticks.

2. Materials and methods

Rhipicephalus sanguineus s.l. adult ticks were collected from dogs in Luxor (25°41'N; 32°65'E), Egypt, during May 2013 and June 2013. Ticks from Egypt were determined as *R. sanguineus* s.l. when they were morphologically compatible with the description of “*R. sanguineus*” presented in Walker et al. (2000). Ticks were stored at –80 °C until further processing. DNA was extracted from individual ticks using the MagNA Pure LC RNA/DNA Kit (Roche, Mannheim, Germany) in a MagNA Pure LC instrument (Roche) according to the instructions of the manufacturer. A fragment of the 16S rRNA and 12S rRNA genes were amplified using the polymerase chain reaction (PCR) protocols described by Mangold et al. (1998a,b) and Beati and Keirans (2001), respectively.

Sequences of different lineages of *R. sanguineus* s.l. from Sub-Saharan Africa (Mozambique, South Africa), America (temperate and tropical areas) and Europe, as well as sequences of species belonging to the *R. sanguineus* group such as *R. camicasi*, *R. guilhoni*, *R. sulcatus*, *R. rossicus*, *R. pusillus*, *R. turanicus* and *R. leporis*, were obtained from GenBank and added to the sequence analyses. Additionally, ticks determined as *R. sanguineus* s.l. collected from dogs in Zambia (Localities: Chikowa (13°26'S, 32°52'E), Jumbe (13°17'S, 32°5'E)) and Romania (Localities: Calarasi (44°12'N, 27°20'E), Timisoara (45°44'N, 21°13'E), Vrancea (44°32'N, 22°35'E), Craiova (44°19'N, 23°48'E), Giurgiu (43°53'N, 25°58'E)) were also processed for DNA extraction and amplification of the respective 16S rRNA and 12S rRNA gene fragments as described above. The sequences obtained from the ticks from Zambia and Romania were by location of their collection considered to be representatives of those *R. sanguineus* s.l. populations distributed in Sub-Saharan Africa and southeastern Europe.

The sequences were edited using BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) with manual edition whenever it was necessary and

aligned with the program Clustal W (Larkin et al., 2007). Phylogenetic analyses were performed with the Maximum-likelihood (ML) method. To construct the ML tree the best-fitting substitution model was determined with the Akaike Information Criterion using the ML model test implemented in MEGA 5 (Tamura et al., 2011). A general time-reversible model with gamma distribution was selected to make the phylogenetic tree with partial 16S rRNA gene sequences. The tree based on partial 12S rRNA gene sequences was generated with the general time reversible model by using gamma distribution with invariant sites. Support for the topologies was tested by bootstrapping over 1000 replications and gaps were excluded in the pairwise comparison. *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888), *Rhipicephalus annulatus* (Say, 1821), *Rhipicephalus decoloratus* Koch, 1844; *Rhipicephalus bursa* Canestrini and Fanzago, 1878, *Rhipicephalus australis* Fuller, 1899 and *Rhipicephalus kochi* Dönitz, 1905 were considered as outgroup.

Finally, the number of variable nucleotide positions between haplotypes was used to calculate pairwise estimates of percent sequence divergence for both 16S rRNA and 12S rRNA genes. These analyses were conducted with the program MEGA 5 (Tamura et al., 2011) by using the Kimura 2-parameter model. All ambiguous positions were removed for each sequence pair.

3. Results

One hundred and thirty six 16S rDNA sequences of *R. sanguineus* s.l. were obtained: 97 from Egypt, 16 from Zambia and 23 from Romania. Sequences from Egypt were grouped in nine different haplotypes (Egypt haplotypes I–IX), those from Zambia in four different haplotypes (Zambia haplotypes I–IV), and the Romanian sequences were grouped in five different haplotypes (Romania haplotypes I–V). Twenty-seven 12S rRNA gene sequences of *R. sanguineus* s.l. were also obtained and included in the analysis: 22 sequences from Egypt grouped in three different haplotypes (haplotypes Egypt I–III), four sequences from Zambia belonging to the same haplotype, and one sequence from Romania. The length of the sequences alignments of the 16S rRNA and 12S rRNA genes were ca. 330 bp.

The ML tree constructed with 16S rRNA gene sequences showed that the species of the *R. sanguineus* group considered in this study are grouped in six different clades formed by the following taxa: clade I) *R. sanguineus* s.l. “tropical lineage” (tropical areas of America, Sub-Saharan Africa), *R. camicasi* and *R. guilhoni*; clade II) *R. turanicus*; III) *R. sanguineus* s.l. lineage from the “southeastern Europe”; IV) *R. pusillus*; V) *R. rossicus*; VI) *R. sanguineus* “temperate lineage” (temperate and cold areas of South America and North America, western Europe). The haplotypes I–VI of *R. sanguineus* s.l. from Egypt (Genbank accession numbers: KY413777–KY413782) were associated to the phylogenetic clade I which is formed by sequences of the “tropical lineage” of *R. sanguineus* s.l., *R. camicasi* and *R. guilhoni* (Fig. 1). The four 16S haplotypes from Zambia (Genbank accession numbers: KY413786–KY413789) were also grouped to this clade (Fig. 1). The remaining three 16S haplotypes of *R. sanguineus* s.l. from Egypt (VII–IX; Genbank accession numbers: KY413783–KY413785) formed the clade III (named here colloquially “southeastern Europe”) with 16S rRNA gene sequences of *R. sanguineus* s.l. from Turkey and the five 16S haplotypes from Romania (Genbank accession numbers: KY413790–KY413794) obtained in this work (Fig. 1).

In the phylogenetic analysis performed with 12S rRNA gene sequences (Fig. 2), the species belonging to the *R. sanguineus* species group were mostly clustered in the same clades observed in the tree constructed with 16S rRNA gene sequences. The clade I was formed by *R. sanguineus* s.l. “tropical lineage”, *R. camicasi*, *R. guilhoni*, two haplotypes of *R. sanguineus* s.l. from Egypt (haplotypes I–II; Genbank accession numbers: KY413800–KY413801) and one haplotype of *R. sanguineus* s.l. from Zambia (Genbank accession number: KY413803). The clade III was formed by one haplotype of *R. sanguineus* s.l. from Egypt (haplotype III; Genbank accession number: KY413802) and two

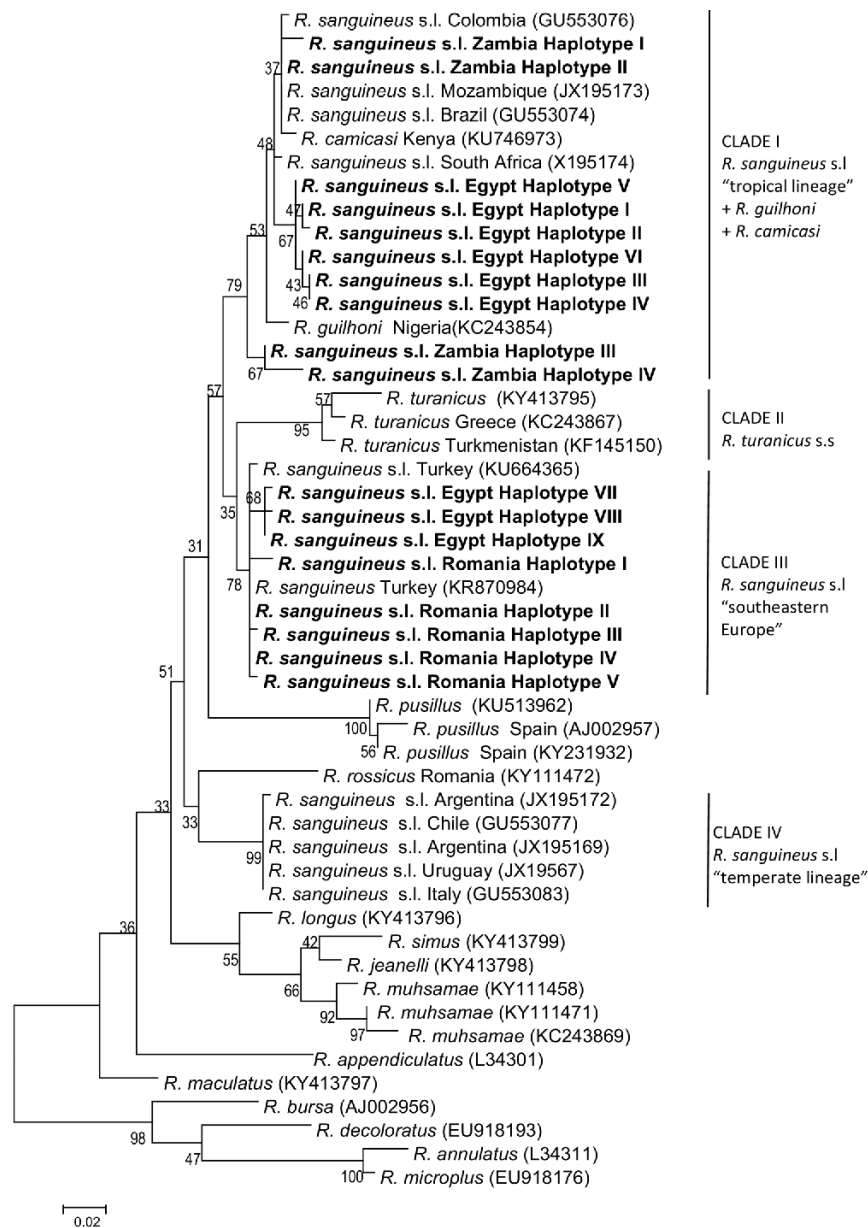


Fig. 1. Maximum-likelihood tree based on partial 16S rRNA gene sequences of tick species of the genus *Rhipicephalus*. Numbers represent bootstrap support generated from 1000 replications. GenBank accession numbers are indicated in brackets.

haplotypes from southeastern Europe, one belonging to *R. sanguineus* s.l. from Romania (haplotype I, obtained in this study, Genbank accession number: KY413804) and the other one of *R. sanguineus* s.l. from Greece (morphotype I sensu Dantas-Torres et al., 2013). The remaining three clades of the *R. sanguineus* species group comprise *R. turanicus*, *R. sanguineus* s.l. "temperate lineage" + *R. turanicus* from France,² and *R. rossicus* (Fig. 2).

² It is important to mention that unlike what occurs with *R. sanguineus* s.l. the taxon *R. turanicus* is formally well defined (see Filippova, 1997) and phylogenetically represents an independent lineage (see Figs. 1 and 2 of this work and Dantas-Torres et al., 2013). Currently, from a morphological point of view, it is not possible to assign the specific epithet *turanicus* to any population apart from those morphologically defined in Filippova

The nucleotide divergence among the 16S rRNA and 12S rRNA gene sequences of *R. sanguineus* s.l. are presented in Tables 1 and 2, respectively. In the case of 16S rRNA gene sequences, the pairwise

(footnote continued)

(1997). Walker et al. (2000) consider *bona fide* data those on *R. turanicus* in Pegram et al. (1987), but under the morphological indefiniteness of most populations of *R. turanicus* that decision is unsound (Guglielmone and Nava, 2014). The study by Pegram et al. (1987) comparing Palearctic and Afrotropical populations did not clarify the status of *R. turanicus* because there is no guarantee that these investigators were working with *bona fide* *R. turanicus* (Guglielmone and Nava, 2014). The same applies to the work of Estrada-Peña and Sanchez (1988) for specimen from western Europe. In conclusion, the taxonomic status of the ticks determined as *R. turanicus* in western Europe and Africa should be carefully evaluated.

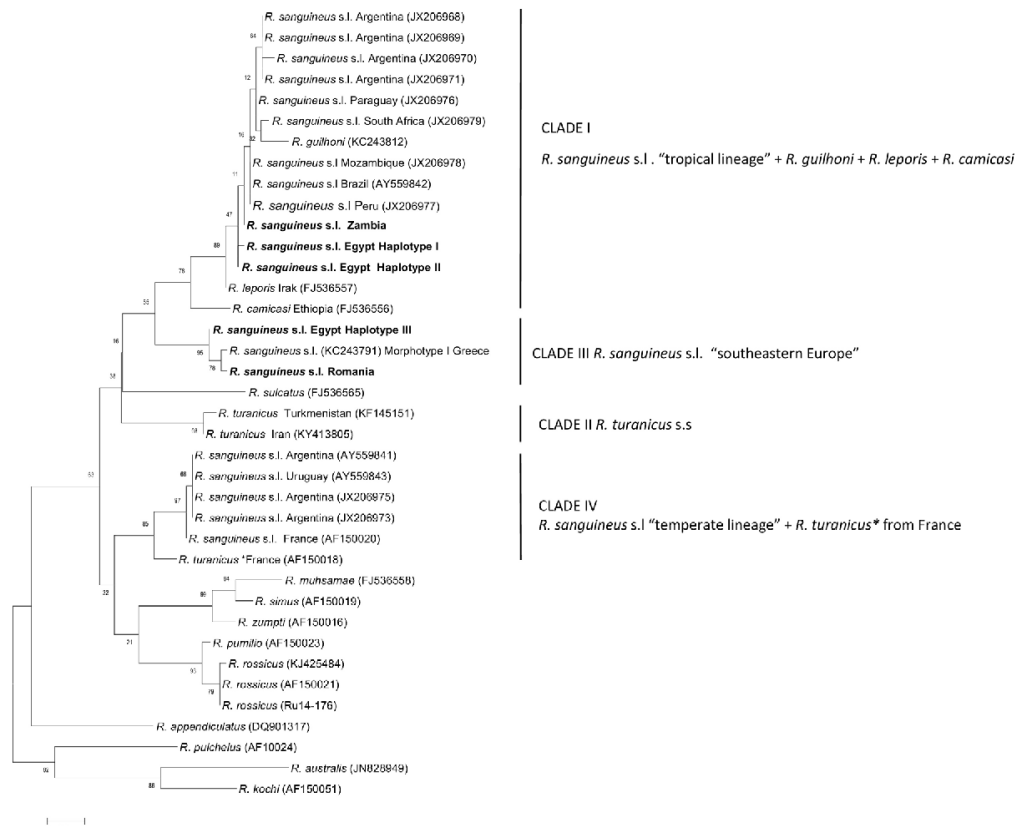


Fig. 2. Maximum-likelihood tree based on partial 12S rRNA gene sequences of tick species of the genus *Rhipicephalus*. Numbers represent bootstrap support generated from 1000 replications. GenBank accession numbers are indicated in brackets. * See footnote number 2 in the section "results".

differences within the clade I ranged from 0.1% to 2.8%, and in clade III from 0.1% to 1.8% (Table 1). The differences among all the clades of the *R. sanguineus* species group included in the phylogenetic analysis (Fig. 1) were always higher than 3.1%. Regarding 12S rRNA gene sequences, the nucleotide divergence within clade I formed by *R. sanguineus* s.l. "tropical lineage", *R. guilhoni*, *R. leporis*, *R. camicasi*, *R. sanguineus* s.l. from Zambia and *R. sanguineus* s.l. from Egypt (haplotypes I–II) ranged from 0% to 2.3%, although the sequence of *R. camicasi* from Ethiopia differed with the remaining sequences of this clade in values ranging from 3.2% to 3.6% (Table 2). The nucleotide divergence in 12S rRNA gene sequences within the clade II (*R. sanguineus* s.l. from southeastern Europe) was from 0.6% to 1.2% (Table 2). The nucleotide divergence in 12S rRNA gene sequences among the clades identified in the phylogenetic tree constructed with 12S rRNA gene sequences (Fig. 2) was always higher than 5.1%.

4. Discussion

The results based on mitochondrial DNA sequences obtained during this work have been shown that at least two different lineages of *R. sanguineus* s.l. (clades I and III in our analyses) are living in sympatry in Africa north of the Sahara. One of these mitochondrial lineages including six different haplotypes belongs to the same evolutionary entity (i.e. the same taxon) as *R. sanguineus* s.l. from tropical areas of America, *R. sanguineus* s.l. from Sub-Saharan Africa (populations from Zambia, Mozambique and South Africa are being considered herein), *R. camicasi* and *R. guilhoni*. In the phylogenetic analysis constructed with 12S rRNA gene sequences, *R. leporis* from Iraq also clustered with this

clade. The close relationship within the members of this evolutionary entity suggests that they could belong to the same species which is clearly different to the evolutionary entity formed by *R. sanguineus* s.l. from western Europe and temperate areas of America. As it is widely recognized, these two evolutionary entities are not only genetically different but also biologically incompatible (Szabó et al., 2005; Burlini et al., 2010; Moraes-Filho 2011; Levin et al., 2012; Nava et al., 2012; Dantas-Torres et al., 2013; Sanches et al., 2016). The taxon formed by *R. sanguineus* s.l. ticks from western Europe and temperate areas of America probably represents *R. sanguineus* s.s. (see Nava et al., 2015 for the roots of this taxonomic decision). Consequently, the name *R. sanguineus* s.s. (or *R. sanguineus* (Latreille, 1806)) should neither be assigned to the evolutionary entity formed by *R. sanguineus* s.l. from tropical areas of America, *R. sanguineus* s.l. from Sub-Saharan Africa, *R. camicasi*, *R. guilhoni* nor *R. sanguineus* s.l. from Africa north of the Sahara (*R. sanguineus* s.l. from Egypt, haplotypes I–VI of 16S and haplotypes I–II of 12S obtained in this study). According to the principle of priority established by the International Code of Zoological Nomenclature (ICZN, 1999), the ticks belonging to this evolutionary entity (clade I of this study) should be called *R. guilhoni* because it was described by Morel and Vassiliades in 1963, while *R. camicasi* was described later by Morel et al. (1976). However, neither Morel and Vassiliades (1963) nor Morel et al. (1976) have compared the specimens that they used for the descriptions of both *R. guilhoni* and *R. camicasi* with the type specimens of some species from central and northern Africa that were considered as synonyms of *R. sanguineus* s.s. in Camicas et al. (1998) and Walker et al. (2000), namely *Rhipicephalus brevicollis* Neumann 1897 (type locality: Mombasa, Kenya), *Rhipicepha-*

Table 1

Matrix of sequence divergence (% nucleotide difference), showing the pair-wise comparisons of the 16S rDNA sequences among the haplotypes of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1	–																									
2	0.3	–																								
3	0.6	0.3	–																							
4	0.9	0.6	0.1	–																						
5	0.3	0.6	0.6	0.6	–																					
6	0.6	0.9	0.3	0.3	0.3	–																				
7	1.8	2.1	2.1	2.1	1.5	1.8	–																			
8	1.5	1.8	1.8	1.8	1.2	1.5	0.3	–																		
9	1.5	1.8	1.8	1.8	1.2	1.5	0.3	0.1	–																	
10	1.5	1.2	1.2	1.2	1.2	1.5	0.9	0.6	0.6	–																
11	1.5	1.8	1.2	1.2	1.2	0.9	0.9	0.6	0.6	1.2	–															
12	2.4	2.5	2.6	2.3	2.1	2.3	1.8	1.5	1.5	1.5	2.1	–														
13	2.1	2.3	1.5	2.3	2.1	2.3	1.2	0.9	0.9	1.5	1.5	2.3	–													
14	1.5	1.8	1.8	1.8	1.2	1.5	0.3	0.1	0.1	0.6	0.6	1.5	0.9	–												
15	2.6	2.7	2.7	2.6	2.5	2.6	2.5	2.4	2.5	2.5	2.6	2.6	2.5	2.5	–											
16	2.8	2.8	2.8	2.7	2.8	2.8	2.6	2.6	2.7	2.7	2.8	2.8	2.6	2.7	1.1	–										
17	3.4	3.4	3.7	4.0	3.7	4.0	4.3	4.0	4.0	3.7	4.0	3.7	4.7	4.0	3.2	4.4	–									
18	3.7	3.7	3.1	3.1	3.4	3.1	4.4	4.0	4.0	3.7	3.7	3.7	5.0	4.0	3.1	4.7	0.6	–								
19	3.7	3.7	3.7	3.7	3.4	3.7	4.0	3.7	3.7	3.4	3.7	3.4	4.7	3.7	3.1	4.4	0.3	0.3	–							
20	4.7	4.7	4.7	4.7	4.3	4.7	4.0	3.7	3.7	3.7	4.3	3.7	4.7	3.7	3.7	5.3	1.8	1.8	1.5	–						
21	3.7	3.7	3.7	3.7	3.4	3.7	3.4	3.1	3.1	2.9	3.7	2.9	4.0	3.1	3.2	4.4	0.9	0.9	0.6	0.9	–					
22	4.0	4.0	4.0	4.0	3.7	4.0	3.7	3.4	3.4	3.1	4.0	3.1	4.3	3.4	3.2	4.7	1.2	1.2	0.9	1.2	0.3	–				
23	3.7	3.7	3.7	3.7	3.4	3.7	3.4	3.1	3.1	2.9	3.7	2.9	4.0	3.4	3.1	4.4	0.9	0.9	0.6	0.9	0.1	0.3	–			
24	4.0	4.0	4.0	4.0	3.7	4.0	3.7	3.4	3.4	3.1	4.0	3.1	4.3	3.1	3.1	4.7	1.2	1.2	0.9	1.2	0.3	0.6	0.1	–		
25	3.7	3.7	3.7	3.7	3.4	3.7	3.4	3.1	3.1	2.9	3.7	2.9	4.0	3.1	3.1	4.4	0.9	0.9	0.6	0.9	0.1	0.3	0.1	0.3	–	
26	4.0	4.0	3.4	3.4	3.7	3.4	3.7	3.4	3.4	3.1	3.4	3.1	4.3	3.4	3.2	4.7	1.2	0.6	0.9	1.2	0.3	0.6	0.3	0.6	0.3	–

H: haplotype. 1. *R. sanguineus* s.l. Egypt HI; 2. *R. sanguineus* s.l. Egypt HII; 3. *R. sanguineus* s.l. Egypt HIII; 4. *R. sanguineus* s.l. Egypt HIV; 5. *R. sanguineus* s.l. Egypt HV; 6. *R. sanguineus* s.l. Egypt HVI; 7. *R. sanguineus* s.l. Colombia; 8. *R. sanguineus* s.l. Brazil; 9. *R. sanguineus* s.l. South Africa; 10. *R. sanguineus* s.l. Mozambique; 11. *R. camicasi* Kenya; 12. *R. guilhoni* Nigeria; 13. *R. sanguineus* s.l. Zambia HI; 14. *R. sanguineus* s.l. Zambia HII; 15. *R. sanguineus* s.l. Zambia HIII; 16. *R. sanguineus* s.l. Zambia HIV; 17. *R. sanguineus* s.l. Egypt HVII; 18. *R. sanguineus* s.l. Egypt HVIII; 19. *R. sanguineus* s.l. Egypt HIX; 20. *R. sanguineus* s.l. Romania HI; 21. *R. sanguineus* s.l. Romania HII; 22. *R. sanguineus* s.l. Romania HIII; 23. *R. sanguineus* s.l. Romania HIV; 24. *R. sanguineus* s.l. Romania HV; 25. *R. sanguineus* Turkey I; 26. *R. sanguineus* Turkey II.

Table 2

Matrix of sequence divergence (% nucleotide difference), showing the pair-wise comparisons of the 12S rDNA sequences among the haplotypes of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	–														
2	0.3	–													
3	0.6	0.3	–												
4	2.3	2.0	2.3	–											
5	3.6	3.5	3.6	3.3	–										
6	0.9	0.6	0.9	2.0	3.2	–									
7	0.6	0.3	0.6	1.8	3.2	0.9	–								
8	0.9	0.6	0.3	2.1	3.6	1.2	0.3	–							
9	0.9	0.6	0.3	2.1	3.6	1.2	0.3	0.0	–						
10	1.2	0.9	1.2	1.8	3.6	1.5	0.6	0.9	0.9	–					
11	0.9	0.6	0.3	2.1	3.6	1.2	0.3	0.0	0.0	0.9	–				
12	0.9	0.6	0.9	2.1	3.6	1.2	0.3	0.6	0.6	0.9	0.6	–			
13	6.0	5.7	6.0	6.0	5.1	5.4	6.0	6.3	6.3	6.0	6.3	6.3	–		
14	6.7	6.4	6.7	6.7	5.7	6.0	6.7	7.0	7.0	6.7	7.0	7.0	1.2	–	
15	6.6	6.3	6.6	6.0	5.1	6.0	6.0	6.3	6.3	6.0	6.3	6.3	1.2	0.6	–

H: haplotype. 1. *R. sanguineus* s.l. Egypt HI; 2. *R. sanguineus* s.l. Egypt HII; 3. *R. sanguineus* s.l. Zambia HI; 4. *R. guilhoni*; 5. *R. camicasi* Ethiopia; 6. *R. leporis* Irak; 7. *R. sanguineus* s.l. Paraguay; 8. *R. sanguineus* s.l. Brazil; 9. *R. sanguineus* s.l. Peru; 10. *R. sanguineus* s.l. South Africa; 11. *R. sanguineus* s.l. Mozambique; 12. *R. sanguineus* s.l. Argentina (tropical lineage); 13. *R. sanguineus* s.l. Egypt HIII; 14. *R. sanguineus* s.l. Romania; 15. *R. sanguineus* s.l. Morphotype I Greece.

lus limbatus Koch, 1844 (type locality: Egypt), *Rhipicephalus punctatissimus* Gerstäcker 1873 (type locality: Mombasa, Kenya), *Rhipicephalus rutilus* Koch, 1844 (type locality: Egypt), and *Rhipicephalus stigmaticus* Gerstäcker 1873 (type locality: Mombasa, Kenya). The types of these taxa should be examined to determine whether the name of some of them should be assigned to the evolutionary entity composed by *R. sanguineus* s.l. from Sub-Saharan Africa, *R. camicasi*, *R. guilhoni* and *R. sanguineus* s.l. from Africa north of the Sahara, because they would have priority over *R. camicasi* and *R. guilhoni*. All the species above described by Koch (1844), Gerstäcker (1873) and Neumann (1897) are treated as names *incertae sedis* in Guglielmo and Nava (2014) but the type specimens for all of them are held in the Berlin Museum (Moritz and Fischer, 1981) therefore available for scrutiny. Also, future studies

should include specimens of *R. camicasi* and *R. guilhoni* from areas near their type localities in the genetic and morphological comparisons in order to determine whether these species effectively belong to a same specific entity composed by *R. camicasi*, *R. guilhoni* and *R. sanguineus* s.l. from Africa north of the Sahara, *R. sanguineus* s.l. from tropical areas of America and *R. sanguineus* s.l. from Sub-Saharan Africa.

The other mitochondrial lineage of *R. sanguineus* s.l. from Egypt found during this study is phylogenetically associated to *R. sanguineus* s.l. ticks from Romania (sequences obtained in this work), Turkey (sequences obtained by Hekimoglu et al., 2016) and Greece (morphotype I sensu Dantas-Torres et al., 2013). The genetic divergence between the two mitochondrial lineages of *R. sanguineus* s.l. detected in Africa north of the Sahara range from 3.1% to 4% in 16S rRNA gene

sequences and from 6% to 6.7% in 12S rRNA gene sequences. The biological significance of these genetic differences in mitochondrial DNA must be evaluated with additional lines of evidence (i.e. cross mating, ecological and morphological comparisons) as it was done for the temperate and tropical lineages of *R. sanguineus* s.l. (Oliveira et al., 2005; Szabó et al., 2005; Levin et al., 2012; Sanches et al., 2016; Labruna et al., 2017). This is important in view of the high probability of frequent inbreeding events between these two mitochondrial lineages of *R. sanguineus* s.l. detected during this study in Africa north of the Sahara. Also, the analyses based on relatively short sequences of mitochondrial genes have some limitations, as the smaller effective population size may lead to coalescence of haplotype lineages in populations that are only temporarily isolated producing an over-resolution of mtDNA trees (Sites and Crandall, 1997; Wiens and Penkrot, 2002). Therefore, further research is needed to establish accurately the taxonomic relationships between the two mitochondrial lineages of *R. sanguineus* s.l. (clades I and III of this work) present in Africa north of the Sahara.

The name *R. sanguineus* s.s. cannot be assigned to any tick population in the world at the current state of knowledge, due to the lack of an accurate morphological definition and because of the existence of different mitochondrial lineages, some of them reproductively incompatible among each other (Nava et al., 2015). The presence of two sympatric lineages in Africa north of the Sahara was demonstrated in this work, one of them closely related to *R. camicasi*, *R. guilhoni* and *R. sanguineus* s.l. populations from sub-Saharan Africa and tropical areas of America, and the other one closely related to populations of *R. sanguineus* s.l. distributed in southeastern Europe. But the taxonomic status of these taxa will remain unresolved until a neotype of *R. sanguineus* s.s. becomes established and new lines of evidence complement the current results based on mitochondrial DNA.

Acknowledgements

Part of this work was funded by the German Center of Infection Research (DZIF). The financial support to SN and AAG was provided by INTA, Asociación Cooperadora INTA Rafaela and CONICET. The work of MP was done under the frame of EurNegVec COST Action TD1303.

References

- Beati, L., Keirans, J.E., 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J. Parasitol.* 87, 32–48.
- Burlini, L., Teixeira, K.R.S., Szabó, M.P.J., Farnadas, K.M., 2010. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? *Exp. Appl. Acarol.* 50, 361–374.
- Camicas, J.L., Hervy, J.P., Adam, F., Morel, P.C., 1998. Les Tiques du Monde. Nomenclature, Stades Décrits, Hôtes, Répartition. Orstom, Paris 233 pp.
- Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2015. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Vet. Parasitol.* 208, 9–13.
- Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S., Annoscia, G., Gianelli, A., Parisi, A., Otranto, D., 2013. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. *Parasites Vectors* 6, 213.
- Dantas-Torres, F., Maia, C., Latrofa, M.S., Annoscia, G., Otranto, D., 2017. Genetic characterization of *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) ticks from dogs in Portugal. *Parasites Vectors* 10, 133.
- Eremeeva, M.E., Zambrano, M.L., Anaya, L., Beati, L., Karpathy, S.E., Santos-Silva, M.M., Salceda, B., MacBeth, D., Olguin, H., Dasch, G.A., Aranda, C.A., 2011. *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus* ticks. *J. Med. Entomol.* 48, 418–421.
- Estrada-Peña, A., Sanchez, C., 1988. Morfología comparada de *Rhipicephalus sanguineus* y *R. turanicus* (Acarina: Ixodidae). *Rev. Ibér. Parasitol.* 48, 51–62.
- Filippova, N.A., 1997. Ixodid ticks of the subfamily Amblyomminae. Fauna of Russia and Neighbouring Countries, 4 (5). Nauka Publishing House, St. Petersburg 436 pp., In Russian.
- Gerstaecker, A., 1873. Gliedertheorie (Insekten, Arachniden, Myriapoden und Isopoden). In: Kersten, O. (Ed.). Baron Carl Claus von der Decken's Reisen in Ost Africa in den Jahre 1859 bis 1861. 3. Wissenschaftlicher Theil. C.J. Winter'sche Verlaghandlung, Leipzig und Heidelberg 542 pp.
- Guglielmone, A.A., Nava, S., 2014. Names for Ixodidae (Acari: Ixodoidea): valid, synonyms, *incertae sedis*, *nomina dubia*, *nomina nuda*, *lapsus*, incorrect and suppressed names with notes on confusions and misidentifications. *Zootaxa* 3767 256 pp.
- Guglielmone, A.A., Robbins, R.G., Apanaskevich, D.A., Petney, T.N., Estrada-Peña, A., Horak, I., 2014. The Hard Ticks of the World. Springer, Dordrecht 738 pp.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Hekimgolu, O., Saglam, I.K., Ozer, N., Estrada-Peña, A., 2016. New molecular data shed light on the global phylogeny and species limits of the *Rhipicephalus sanguineus* complex. *Ticks Tick-Borne Dis.* 7, 798–897.
- International Commission on Zoological Nomenclature, 1999. International Code of Zoological Nomenclature, fourth edition. International Trust for Zoological Nomenclature, London 156 pp.
- Jones, E.O., Gruntemir, J.M., Hamer, S.A., Little, S.E., 2017. Temperate and tropical lineages of brown dog ticks in North America. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* 7, 58–61.
- Koch, C.L., 1844. Systematische Übersicht über die Ordnung der Zecken. *Arch. Naturgesch.* 10, 217–239.
- Labruna, M.B., Gerardi, M., Krawczak, F.S., Moraes-Filho, J., 2017. Comparative biology of the tropical and temperate species of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) under different laboratory conditions. *Ticks Tick-Borne Dis.* 8, 146–156.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
- Latreille, P.A., 1806. Genera crustaceorum et insectorum secundum ordinem naturalem in familia disposita, iconibus exemplisque plurimis explicata, vol. 1 Amand Koenig Paris et Argentorati, 302 pp.
- Levin, M.L., Studer, E., Killmaster, L., Zemtsova, G., Mumcuoglu, K.Y., 2012. Crossbreeding between different geographical populations of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 58, 51–68.
- Liu, G.H., Chen, Y.Z., Song, H.Q., Lin, R.Q., Zhou, D.H., Zhu, X.Q., 2013. Complete mitochondrial genome sequence data provides evidence that dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) represents a species complex. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 361–369.
- Mangold, A.J., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 1998a. 18S rRNA gene sequence and phylogenetic relationships of European hard-tick species (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 84, 31–37.
- Mangold, A.J., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 1998b. Mitochondrial 16S rRNA sequences and phylogenetic relationships of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 84, 478–484.
- Moraes-Filho, J., Marcelli, A., Nieri-Bastos, F., Richtzenhain, L.J., Labruna, M.B., 2011. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Trop.* 117, 51–55.
- Morel, P.C., Vassiliades, G., 1963. Les *Rhipicephalus* du groupe *sanguineus*: espèces Africaines (Acariens: Ixodoidea). *Rev. Elev. Méd. vet. Pays trop.* 15, 343–386.
- Morel, P.C., Mouchet, J., Rodhain, F., 1976. Description de *Rhipicephalus camicasi* n. sp. (Acariens, Ixodidae) des steppes subdésertiques de la plaine afar. *Rev. Elev. Méd. vet. Pays trop.* 29, 337–340.
- Moritz, M., Fischer, S.C., 1981. Die Typen der Arachniden-Sammlung des Zoologischen Museums Berlin. *Mitt. Zool. Mus. Berlin* 57, 341–364.
- Nava, S., Mastropalo, M., Venzal, J.M., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 2012. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. *Vet. Parasitol.* 190, 547–555.
- Nava, S., Estrada-Peña, A., Petney, T., Beati, L., Labruna, M.B., Szabó, M.P.J., Venzal, J.M., Mastropalo, M., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 2015. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Vet. Parasitol.* 208, 2–8.
- Neumann, L.G., 1897. Révision de la famille des Ixodidés (2^e mémoire). *Mem. Soc. Zool. Fr.* 10, 324–420.
- Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Denardi, S.E., Saito, C.S., Nunes, E.T., Szabó, M.P.J., Camargo Mathias, M.I., 2005. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. *Vet. Parasitol.* 129, 139–147.
- Pegram, R.G., Clifford, C.M., Walker, J.B., Keirans, J.E., 1987. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari: Ixodidae). I. *R. sulcatus* Neumann, 1908 and *R. turanicus* Pomerantsev, 1936. *Syst. Parasitol.* 10, 3–26.
- Sanches, G.S., Evora, P.M., Mangold, A.J., Jittapalpong, S., Rodríguez-Mallon, A., Guzmán, P.E.E., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2016. Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 215, 78–87.
- Sites, J.W., Crandall, K.A., 1997. Testing species boundaries in biodiversity studies. *Conserv. Biol.* 11, 1289–1297.
- Szabó, M.P.J., Mangold, A.J., Joao, C.F., Bechara, G.H., Guglielmone, A.A., 2005. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. *Vet. Parasitol.* 130, 131–140.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5 Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Walker, J.B., Keirans, J.E., Horak, I.G., 2000. The Genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae): A Guide to the Brown Ticks of the World. Cambridge University Press, Cambridge 643 pp.
- Wiens, J.J., Penkrot, T.A., 2002. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Syst. Biol.* 51, 69–91.
- Zahler, M., Filippova, N.A., Morel, P.C., Gothe, R., Rinder, H., 1997. Relationships between species of the *Rhipicephalus sanguineus* group: a molecular approach. *J. Parasitol.* 83, 302–306.
- Zemtsova, G., Apanaskevich, D.A., Reeves, W.K., Hahn, M., Snellgrove, A., Levin, M., 2016. Phylogeography of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and its relationships with climate factors. *Exp. Appl. Acarol.* 69, 191–203.

4 DISKUSSION

In dieser Studie wurden *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato-Zeckenpopulationen aus Ägypten mit Zecken aus Subsahara-Afrika, Amerika und Europa anhand der zwei mitochondrialen 12S rRNA und 16S rRNA Gene verglichen. Ebenso herangezogen wurden folgende, der *Rhipicephalus sanguineus*-Gruppe zugehörigen Arten: *Rhipicephalus camicasi*, *Rhipicephalus guilhoni*, *Rhipicephalus sulcatus*, *Rhipicephalus rossicus*, *Rhipicephalus pusillus*, *Rhipicephalus turanicus* und *Rhipicephalus leporis*.

Dabei zeigte sich, dass mindestens zwei verschiedene genetische Linien von *R. sanguineus* s.l. in Nordafrika koexistieren. Von den insgesamt 97 untersuchten *R. sanguineus* s.l. aus Ägypten konnten mit 16S rRNA Gensequenzen neun verschiedene Haplotypen gebildet werden. Sechs Haplotypen bildeten ein Cluster mit *R. sanguineus* s.l. der „tropical lineage“ aus Amerika, *R. sanguineus* s.l. aus Mosambik, Südafrika und Sambia sowie *R. camicasi* und *R. guilhoni*. Auf Basis des 12S rRNA Gens ist *R. leporis* ebenfalls Teil dieses Clusters. Die restlichen drei Haplotypen auf Grundlage des 16S rRNA Gensegments lassen sich in ein Cluster mit südosteuropäischen *R. sanguineus* s.l. Populationen aus Rumänien und der Türkei einordnen.

Die nahverwandten *R. sanguineus* s.l. Haplotypen der „tropical lineage“ grenzen sich deutlich von den Spezies der „temperate lineage“ ab, was die Existenz von mindestens zwei verschiedenen Arten unter demselben Namen nahelegt. Dieser Zusammenhang ist für Populationen in Südamerika bereits genau geschrieben worden, welche sowohl auf genetischer als auch biologischer Ebene verschieden bzw. inkompatibel sind (SZABO et al. 2005, DE OLIVEIRA et al. 2005, BURLINI et al. 2010, NAVA et al. 2012). Da laut NAVA et al. (2015) davon ausgegangen wird, dass *R. sanguineus* sensu stricto den Zecken der „temperate lineage“ entspricht, sollte bei dem hier beschriebenen Cluster bestehend aus *R. sanguineus* s.l. der „tropical lineage“, der sechs ägyptischen Haplotypen, *R. sanguineus* s.l. aus Subsahara-Afrika, *R. camicasi* und *R. guilhoni* nicht von *R. sanguineus* s.s. gesprochen werden. Laut der Regeln des International Code of Zoological Nomenclature (ICZN, 1999), muss für diese genetisch korrelierende Gruppe der Name gewählt werden, der als erstes publiziert wurde. In diesem Falle *R. guilhoni*, da dieser Name schon 1963 von Morel und Vassiliades beschrieben wurde. Allerdings sollten sowohl weitere phylogenetische Analysen und morphologische Beschreibungen von *R. guilhoni*, als auch von früher beschriebenen Synonymen der *R. sanguineus*-Gruppe in Afrika erfolgen, bevor ein Name festgelegt werden kann (CAMICAS 1998, WALKER et al. 2000). Im Gegensatz zur fehlenden, namensgebenden Zecke *R. sanguineus* (LATREILLE 1806) sind Zeckenspezies aus dem 19. Jahrhundert aus beispielsweise Kenia und Ägypten von KOCH (1844), GERSTÄCKER (1873) und NEUMANN (1897) im Berlin Museum erhalten und könnten somit für genetische Sequenzanalysen herangezogen werden (MORITZ und FISCHER 1981).

Die Bedeutung der monophyletischen Gruppe von *R. sanguineus* s.l. aus Südosteuropa, bestehend aus drei ägyptischen Haplotypen, *R. sanguineus* s.l. aus Rumänien und der Türkei (Sequenzen des 16S rRNA Gens), bzw. aus Griechenland (basierend auf 12S rRNA Gensegmenten) muss durch weitere Untersuchungen, wie Kreuzungsversuche und genaue morphologische Analysen, ähnlich wie für die „temperate lineage“ und „tropical lineage“, noch eruiert werden. Genetisch unterscheidet sich diese Gruppe zu den Sequenzen der „tropical lineage“ zugehörigen ägyptischen Zecken im 16S rRNA Gensegment um 3,1-4 % und im 12S rRNA Gen um 6-6,7 %. In einer Studie an türkischen Populationen von *R. sanguineus* s.l. konnte dieses Cluster, welches sich von den beiden bekannten phylogenetischen Linien abgrenzt, ebenfalls dargestellt werden (HEKIMOGLU et al. 2016).

Eine aktuelle Studie aus Ägypten liefert Daten zu *R. sanguineus* s.l. aus den Regionen rund um Kairo, Giza und die Sinai Halbinsel. Anhand von fünf genetischen Markern (18S rRNA, ITS2, 12S rRNA, 16S rRNA und COI) werden die dort untersuchten Zecken der sogenannten „temperate lineage“ zugeordnet (ABDULLAH et al. 2016). Somit wurden beide großen *R. sanguineus*-Cluster in Ägypten genetisch nachgewiesen. Folgt man der Eingliederung der Cluster nach Breitengraden von BURLINI et al. (2010), so befinden sich die *R. sanguineus*-Populationen der „temperate lineage“ oberhalb von 29° nördlicher und unterhalb 30° südlicher Breite, die der „tropical lineage“ zwischen 25° nördlicher und 22° südlicher Breite. Ägypten befindet sich zwischen dem 31. bis 21. nördlichen Breitengrad. Dies ist eine mögliche Erklärung für die Detektion von *R. sanguineus* s.l. der „temperate lineage“ im Norden Ägyptens (Kairo: 30° nördlicher Breite; Sinai Halbinsel: 29,3° nördliche Breite) und der von uns phylogenetisch der „tropical lineage“ zugeordneten *R. sanguineus* s.l. aus Oberägypten (Luxor 25,4° nördliche Breite). Zur Bestätigung dieser These sind weitere Studien von *R. sanguineus* s.l. Zecken aus dem Süden Ägyptens notwendig.

Die phylogenetischen Studien sollten hinsichtlich der verschiedenen genetischen Marker kritisch betrachtet werden. Verwendet wurden sowohl nukleare Marker (18S rRNA, ITS2) als auch mitochondriale Gene (12S rRNA, 16S rRNA, COI/coxI). Wichtig ist, wie genau diese Marker den genetischen Unterschied innerhalb und zwischen zwei Arten detektieren. Durchschnittlich beträgt die Differenz zwischen verschiedenen Arten in einer aktuellen Studie im 12S rRNA, 16S rRNA und COI Gensegment 11,1 %, 12,6 % und 15,2 % und innerhalb einer Art entsprechend 0,9 %, 0,9 % und 1 % (LATROFA et al. 2013). Die 18S rRNA eignet sich vorrangig zur Unterscheidung auf der Gattungs-Ebene (DOBSON und BARKER 1999). LV et al. (2014) stellten bei Vergleichen der Genfragmente heraus, dass ITS2 zuverlässiger die Arten des Genus *Ixodes* (100 %), als diejenigen des Genus *Rhipicephalus* (92,98 %) erfassen kann. Auch LATROFA et al. (2013) halten ITS2 für einen ungeeigneten Marker zur Differenzierung von Zecken der *R. sanguineus*-Gruppe. Anhand von Faktoren, wie Länge der Genfragmente und Qualität sowie Reproduzierbarkeit der Sequenzen, gelten die 16S rRNA und COI Gene als zuverlässigste Marker auf Ebene der Artunterscheidung. Außerdem zeichnen sich mitochondriale Gene gegenüber nuklearen Genen durch höhere Mutationsraten, eine ausschließlich maternale Vererbung und das Fehlen von Rekombinationen aus (SHAO

und BARKER 2007, NAVA et al. 2009). Vereinfachend kommt hinzu, dass die verfügbaren Daten und Genbanken für mitochondriale Gene am höchsten sind (LV et al. 2014). 12S rRNA gilt als geeignetes Gensegment für erst kürzlich stattgefundene Artenabspaltungen (NORRIS et al. 1999, MURRELL et al. 1999, BEATI und KEIRANS 2001). Die Sequenzlänge der 12S rRNA und 16S rRNA Genabschnitte liegt jeweils unter 450 bp, die von COI bei 850 bp (LATROFA et al. 2013). Die alleinige Verwendung von mitochondrialen Genen ist allerdings nicht nur positiv zu bewerten. Es wird nur der maternale Gendrift bewertet und Sequenzen aus vielen kurzen mitochondrialen Genabschnitten führen zu einer unverhältnismäßig hohen Anzahl und Vielfalt an phylogenetischen Bäumen (WIENS und PENKROT 2002, HORNOK et al. 2017). Deshalb sollten diese genetischen Analysen immer im Zusammenhang mit morphologisch und biologischen Gesichtspunkten betrachtet werden, was in einigen Studien bereits angewandt wurde (BEATI und KEIRANS 2001, DANTAS-TORRES et al. 2013). Da die meisten der von uns untersuchten Zecken vollgesogen von ihren Wirtstieren abgesammelt wurden, konnten auswertbare Aussagen über morphologische Messdaten nicht getroffen werden. Auf dem Weg zu exakten Analysen werden die Gesamtgenomsequenzen der einzelnen Zeckenarten weitere Erkenntnisse bringen, wie durch laufende Studien an den Genomen von *Ixodes scapularis* und *Rhipicephalus microplus* (PAGEL VAN ZEE et al. 2007). Komplette mitochondriale Genomsequenzen von *R. sanguineus* s.l. Populationen aus China und den USA konnten das Vorliegen von mindestens zwei verschiedenen Arten bereits bestätigen (LIU et al. 2013).

Bis heute herrscht kein Konsens über den Ursprung von *R. sanguineus* s.s. (DANTAS-TORRES 2008, WALKER et al. 2000). Älteste Hinweise auf die Existenz von *R. sanguineus* s.l. in Ägypten liefern, neben einer Grabzeichnung eines Hyänenkopfes mit einer zeckenähnlichen Struktur am Ohr aus dem Jahr 1500 v. Chr., elektronenmikroskopische Untersuchungen von Zecken an mumifizierten Hundemumien in einer römischen Grabanlage in der Nähe der Kharga-Oase (ARTHUR 1965, OTRANTO et al. 2014). OTRANTO et al. (2014) ordnen diese Zecken der *Rhipicephalus* spp. II („temperate lineage“) zu. Diskutiert wird *R. sanguineus* s.s. dabei als afrikanische Zecke oder ursprünglich aus dem Mittelmeerraum, zur Zeit des römischen Imperiums, eingetragene Art. Da unsere Untersuchungen keine *R. sanguineus* s.l. der „temperate lineage“ enthielt, könnte dies eher für die Herkunft von *R. sanguineus* s.s., also der „temperate lineage“, über die Mittelmeerrouten nach Ägypten sprechen, währenddessen *R. sanguineus* s.l. der „tropical lineage“ eine separate, in Afrika beheimatete Art darstellen, welche über den Süden Afrikas Ägypten besiedelt hat. Problematisch ist dabei jedoch, dass in Frankreich bereits beide Cluster nachgewiesen wurden, wodurch die Verbreitungsrouten weniger klar definierbar sind (NAVA et al. 2012, DANTAS-TORRES et al. 2013, LATROFA et al. 2014).

In der Studie von ABDULLAH et al. (2016) wurden *Rickettsia* spp. mit einer Prävalenz von 5,6 % (OmpA und gltA Gen) und 11,89 % (Färbung der Hämolymphe, mikroskopischer Nachweis) in *R. sanguineus* s.l. aus Ägypten beschrieben. In den von uns untersuchten *R. sanguineus* s.l. Zecken konnten nur in drei von 881 (0,34 %) *Rickettsia* spp. nachgewiesen

werden, die jeweils ein schwach positives, nicht sequenzierbares Genprodukt in der generischen Rickettsien real-time PCR ergaben (WÖLFEL et al. 2008). Im Gegensatz zu ABDULLAH et al. (2016) konnten wir keine Zecken der „temperate lineage“ zuordnen, was im Zusammenhang mit dem fehlenden Nachweis von Rickettsien stehen könnte. Weitere Studien sind notwendig, um die Vektorkompetenz von *R. sanguineus* der „temperate lineage“ und „tropical lineage“ für Rickettsien zu vergleichen.

Neue Studien ordnen Zecken-assoziierte Pathogene bereits den einzelnen Clustern der *R. sanguineus*-Gruppe zu. So wurden in einer Studie an weltweit gesammelten *R. sanguineus* s.l. Zecken, Hunde-pathogene Erreger isoliert und den von DANTAS-TORRES et al. (2013) beschriebenen Clustern zugeordnet. *Anaplasma platys* wurde sowohl in *R. sanguineus* s.l. und *Rhipicephalus* sp. I gefunden. *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus* sp. I, II und III und *Cercopithifilaria* spp. sogar in allen Clustern der *R. sanguineus*-Gruppe (LATROFA et al. 2014). *Ehrlichia canis* wurde in mehreren Studien ausschließlich in Populationen der „tropical lineage“ von *R. sanguineus* s.l. detektiert. In dieser Studie wurde auch *Anaplasma platys* in Zecken der „tropical lineage“ nachgewiesen (MORAES-FILHO et al. 2015, CICUTTIN et al. 2015). Im Gegensatz dazu konnte *Rickettsia massiliae* bisher nur der „temperate lineage“ zugeordnet werden (MONJE et al. 2016). Laut MONJE et al. (2016) weisen alle bisherigen Beschreibungen der übrigen *Rickettsia* spp. darauf hin, dass diese auch in *R. sanguineus* s.l. der „tropical lineage“ vorkommen. Dieser Zusammenhang wurde bisher nur für eine Art in einer Studie über *Rickettsia rickettsii* aus Mexiko beschrieben (EREMEEVA et al. 2011, MONJE et al. 2016).

Schlussendlich kann der Name *R. sanguineus* s.s. zum derzeitigen Zeitpunkt für keine weltweit vorkommende Zeckenpopulation verwendet werden, da eine genaue morphologische Beschreibung der erstmals von LATREILLE (1806) beschriebenen Zecke fehlt und mindestens zwei genetische Linien auf Basis von mitochondrialen Gensegmenten existieren. Auch in Ägypten konnten mindestens zwei sympatrische *R. sanguineus* s.l.-Linien bestimmt werden. Die eine zugehörig zu *R. sanguineus*-Populationen der „tropical lineage“ aus Subsahara-Afrika und tropischen Arealen Amerikas, *R. camicasi* und *R. guilhoni*, die andere in genetischer Verwandtschaft zu Populationen aus Südosteuropa. Diese und weitere postulierte Cluster müssen hinsichtlich morphologischer, biologischer und genetischer Gesichtspunkte weiter untersucht werden, bevor ein Neotypus als *R. sanguineus* s.s. bestimmt werden kann.

Auch der zweite von uns in Ägypten beschriebene Vertreter des Genus *Rhipicephalus*, *R. muhsamae*, muss in weiteren Studien Beachtung finden. Die mögliche Verwechslung mit *R. praetextatus* und *R. simus* lässt vermuten, dass das Verbreitungsgebiet und die Bedeutung als Vektor pathogener Mikroorganismen größer sind, als bisher bekannt. Einzig ein unpublizierter Fund durch Clifford wurde von PEGRAM et al. (1987c) erwähnt. Dieses Ergebnis bestätigt die über die Jahre erfolgte Ausbreitung dieser Zeckenart von ihren Ursprüngen in Westafrika bis nach Nordostafrika. *R. muhsamae* wurde das erste Mal weiter ostwärts im Sudan in Nyala von MOREL (1980) beschrieben. Ebenso, wie von WALKER et

al. (2000) 20 Jahre später und von MOHAMMED und HASSAN (2007), welche diese Zeckenart von Schafen im Südosten des Sudans sammelten. Im ebenfalls in Ostafrika befindlichen Kenia wurden fast 40 Jahre nach Erstbeschreibung *R. muhsamae*-Zecken auf einem Dromedar beschrieben (DIOLI und FOX 2004). Dies ist der bisher einzige Fund dieser Art in Kenia, wohingegen im Sudan weitere Individuen beschrieben werden konnten. Die Manifestation von *R. muhsamae* im Sudan scheint daher bereits sicher, nachdem auch in einer aktuellen Studie Individuen im Zentral- und Westsudan beschrieben werden konnten (ELGHALI und HASSAN 2012). Als weiterer Vertreter der Simus-Gruppe gilt auch *Rhipicephalus simus* als etablierte Art im Sudan mit Funden im Norden und in der Nahr an-Nil Provinz (SALIH et al. 2004, AHMED et al. 2005). *Rhipicephalus praetextatus* ist bereits endemisch in Ägypten und wurde schon von PEGRAM et al. (1987c) dort beschrieben. Ebenso wie WALKER et al. (2003) erwähnt eine aktuelle Studie *R. praetextatus* auf Rindern in Ägypten (RAMADAN et al. 2016). Sowohl *R. simus* als auch *R. praetextatus* konnten unter den hier untersuchten Zecken jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die bestehenden Handelsbeziehungen Ägyptens mit dem Sudan entlang des Nils, könnten eine Verbreitungsrouten für *R. muhsamae* nach Nordafrika darstellen, vor allem über den Viehhandel. Da wir diese Zeckenart über fast drei Monate auf verschiedenen Tieren nachweisen konnten, scheint *R. muhsamae* im oberägyptischen Luxor endemisch zu sein. Diese These wird gestützt durch ähnliche klimatische Verhältnisse in Ägypten und in nördlichen und westlichen Regionen des Sudans und damit einhergehend gleichen Lebensbedingungen für diese Zeckenart.

Obwohl *R. muhsamae* als klassische Rinderzecke gilt, konnten wir diese auf Hunden und Pferden finden. ADAMU et al. (2014) konnten nur zwei weibliche und eine männliche Zecke auf Hunden in Nigeria beschreiben, wo *R. muhsamae* ebenfalls seit langem bekannt ist. In einer Studie über Zecken in Guinea-Bissau werden verschiedene Wirte für *R. muhsamae* aufgelistet, z.B. Schweine und Rinder, außerdem einige Funde aus der Vegetation (TERENIUS et al. 2000). Auch die Auflistung der Wirte von *R. muhsamae* in WALKER et al. (2000) zeigt, dass Hunde eher seltener als Wirtstier fungieren. Allerdings könnte bei größerer Beachtung und einer korrekten taxonomischen Eingliederung dieser Zeckenart, möglicherweise eine größere Anzahl auch auf Hunden und anderen Wirtstieren gefunden werden. *R. muhsamae* sollte als Vektor von pathogenen Mikroorganismen zunehmend in Betracht gezogen und untersucht werden, wenn der Hund als Wirt an Bedeutung gewinnt. In dieser Studie konnten keine pathogenen Mikroorganismen nachgewiesen werden, wobei jedoch in diesem Zusammenhang die geringe Anzahl an *R. muhsamae*-Zecken (n=28) beachtet werden muss.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Johanna Maria Langguth

Morphologische und molekulare Charakterisierung von *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato und *Rhipicephalus muhsamae* aus Ägypten

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen

39 Seiten, 5 Abbildungen, 1 Tabelle, 128 Literaturangaben, 2 Publikationen, 1 Anhang

Schlüsselwörter: *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, *Rhipicephalus muhsamae*, Ägypten, Phylogenetik

Einleitung: Durch Zecken-übertragbare Erkrankungen auf Mensch und Tier gewinnen zunehmend an Bedeutung. *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), die braune Hundezecke, ist eine der weltweit am häufigsten vorkommenden Art und zeitgleich kontrovers diskutiert. Aufgrund einer für heutige Standards sehr allgemeingültigen Erstbeschreibung dieser Zeckenart, ist eine klare Definition zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich. Unter dem Namen *R. sanguineus* wurden bisher, gemäß dem aktuellen Stand der Forschung, mindestens zwei verschiedene Arten geführt. Zum einen die „tropical oder northern lineage“ (u.a. tropisches Südamerika, Mosambik, Südafrika) und zum anderen die „temperate oder southern lineage“ (u.a. südliches Südamerika, Westeuropa).

Ziele der Untersuchungen: Ziel der vorliegenden Dissertation war eine phylogenetische Einordnung von *R. sanguineus* s.l. aus Ägypten vorzunehmen sowie die Untersuchung der lokalen Zeckenpopulation auf bestimmte pathogene Infektionserreger.

Tiere, Material und Methoden: In die Untersuchung gingen insgesamt 1030 Zecken ein, gesammelt von verschiedenen Wirtstieren (Hund, Katze, Pferd, Esel, Kamel) von Mai bis Juli 2013 in einer Tierklinik in Luxor, Ägypten. Dokumentiert wurden neben dem Signalement des Wirtstieres und dem Vorstellungsgrund in der Klinik, das Geschlecht, das Entwicklungsstadium und die Lokalisation der Zecken am Tierkörper. Die Zecken wurden morphologisch bestimmt sowie Teilbereiche der zwei mitochondrialen 12S rRNA und 16S rRNA Gene sequenziert. Phylogenetische Analysen unter Verwendung von zugänglichen Sequenzen aus Subsahara-Afrika, Amerika und Europa wurden mit der Maximum-Likelihood-Methode durchgeführt. Die Zecken wurden mittels real-time PCR auf pathogene Infektionserreger (*Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*) untersucht.

Ergebnisse: Insgesamt konnten 881 *R. sanguineus* s.l., 102 *Rhipicephalus annulatus*, 28 *Rhipicephalus muhsamae*, 15 *Hyalomma anatolicum* und vier *Haemaphysalis* sp. sowohl morphologisch als auch anhand von 16S rRNA Gensequenzen bestimmt werden.

Von 97 untersuchten *R. sanguineus* s.l. aus Ägypten konnten mittels 16S rRNA Gensequenzen neun verschiedene Haplotypen bestimmt werden. Sechs Haplotypen bildeten ein Cluster mit *R. sanguineus* s.l. der „tropical lineage“ aus Amerika, *R. sanguineus* s.l. aus

Mosambik, Südafrika und Sambia sowie *R. camicasi* und *R. guilhoni*. Auf Basis des 12S rRNA Gens war *R. leporis* ebenfalls Teil dieses Clusters. Die restlichen drei 16S rRNA Gensegment-Haplotypen ließen sich in ein Cluster mit südosteuropäischen *R. sanguineus* s.l.-Populationen aus Rumänien und der Türkei einordnen. Dabei zeigte sich, dass mindestens zwei verschiedene genetische Linien von *R. sanguineus* s.l. in Nordafrika koexistieren. Unter den untersuchten *R. sanguineus* s.l. konnten nur in drei bzw. acht Zecken ein jeweils schwach positives Signal in den Rickettsien- bzw. *Coxiella burnetii*-real-time PCRs detektiert werden. Da diese durch Sequenzierung nicht bestätigt werden konnten, wurden sie alle negativ befundet.

Rhipicephalus muhsamae ist eine ursprünglich in West- und Zentralafrika verbreitete Rinderzeckenart und konnte hier das erste Mal nördlich der Sahara beschrieben werden. Die PCR-Untersuchungen auf *Rickettsia* spp. und *Coxiella burnetii* verliefen auch hier negativ.

Schlussfolgerungen: Die vorliegende Arbeit konnte auch in Ägypten mindestens zwei Arten unter dem Namen *R. sanguineus* s.l. nachweisen. Bislang waren hier nur Vertreter der sogenannten „temperate lineage“ bekannt, die am nächsten mit Vertretern in Südeuropa verwandt sind. Die hier neu beschriebenen *R. sanguineus* s.l. der „tropical lineage“ haben ihre nächsten Verwandten vermutlich im südlichen Afrika. Der Name *R. sanguineus* sensu stricto sollte zum jetzigen Zeitpunkt nicht verwendet werden, bis auf Basis von eingehenderen phylogenetischen Analysen Einigkeit zu dieser Artbezeichnung gefunden werden kann. In zukünftigen wissenschaftlichen Arbeiten sollte weiterhin von *R. sanguineus* s.l. gesprochen werden, da auch die vorliegende Dissertation genetische Differenzen bestätigen konnte. Die Verbreitung von *Rhipicephalus muhsamae* ist aufgrund der vorliegenden Untersuchung vermutlich weiter fortgeschritten als bisher vermutet. Vor allem auf morphologischer Ebene ist eine Verwechslung mit den nahverwandten Arten *Rhipicephalus praetextatus* und *Rhipicephalus simus* möglich. Hinsichtlich ihrer Verbreitung und der Rolle dieser Zecke als Vektor pathogener Erreger besteht weiterer Forschungsbedarf.

6 SUMMARY

Johanna Langguth

Morphological and molecular characterization of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and *Rhipicephalus muhsamae* from Egypt

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health

39 pages, 5 figures, 1 table, 128 references, 1 appendix

Keywords: *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*, *Rhipicephalus muhsamae*, Egypt, phylogenetic

Introduction: Tick-borne diseases recently become more important in veterinary medicine as well as in human medicine. *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.), also known as the brown dog tick, is one of the most widespread ticks and a subject of a controversial discussion. The first universal description of this tick species makes a specific taxonomic classification nearly impossible. It is believed that at least two genetic different lineages go under the name of *R. sanguineus*. The so called „tropical or northern lineage“ (i.a. tropical South America, Mozambique, South Africa) and the „temperate or southern lineage“ (i.a. southern parts of South America, Western Europe).

Objective: The aim of the dissertation was a phylogenetic classification of *R. sanguineus* s.l. in Egypt and an examination of the local tick population in regard to tick-borne pathogens.

Animals, materials and methods: A total of 1030 ticks was collected from various host animals (dog, cat, horse, donkey, camel) at a veterinary clinic in Luxor, Egypt from May to July 2013. Data on the host's breed, gender, age and presenting problems as well as the life stage and the localization of the ticks on the host was collected. The ticks were identified at morphological level and parts of the two mitochondrial 12S rRNA and 16S rRNA genes were sequenced. Phylogenetic analyses of accessible sequences from sub-Saharan Africa, America and Europe were performed with the Maximum-likelihood method. Real-time PCR examinations were run to detect pathogen agents (*Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*).

Results: All in all 881 *R. sanguineus* s.l., 102 *Rhipicephalus annulatus*, 28 *Rhipicephalus muhsamae*, 15 *Hyalomma anatolicum* und 4 *Haemaphysalis* sp. were morphologically identified and verified using partial 16S gene sequences.

The sequences based on 16S rRNA gene sequences from 97 *R. sanguineus* ticks from Egypt were grouped in nine different haplotypes. Six out of the nine haplotypes were associated with a phylogenetic clade which is formed by sequences of the “tropical lineage” of *R. sanguineus* s.l. from America, Mozambique, South Africa und Zambia as well as *R. camicasi* and *R. guilhoni*. Based on the 12S rRNA gene *R. leporis* also belongs to this clade. The remaining three 16S haplotypes of *R. sanguineus* s.l. from Egypt formed a clade with 16S sequences of Southeast European populations of *R. sanguineus* s.l. from Turkey and

Romania. Only three or eight of the *R. sanguineus* s.l. ticks showed slightly positive results in the real-time PCR for the detection of *Rickettsia* spp. and *Coxiella burnetii*. Further sequencing of the gene products was not possible, so the results were rate negative.

R. muhsamae is a West- and Central African cattle tick. This is the first description of *Rhipicephalus muhsamae* north of the Sahara. PCR examinations could neither detect *Rickettsia* spp. nor *Coxiella burnetii* in *R. muhsamae*.

Conclusion:

This work could demonstrate the presence of at least two sympatric lineages of *R. sanguineus* s.l. in Egypt. In earlier studies, they only found genetic relationships to the so called “temperate lineage”, which has an assumed origin in Southern Europe. *R. sanguineus* s.l. of the present study belonging to the so called “tropical lineage” with a relationship to African ticks. The name *R. sanguineus* sensu stricto cannot be assigned to any tick population at the current state of knowledge because of the existence of different mitochondrial lineages. An accurate species definition needs to be found based on further phylogenetic analysis. This work also confirms the presence of genetic differences so following works should still use the term *R. sanguineus* sensu lato.

Due to morphological similarities of *R. muhsamae* to the other members of the so called Simus-group *Rhipicephalus praetextatus* and *Rhipicephalus simus* the assumption of a wider distribution than previously thought can be suggested. Further studies are necessary to acquire more data about the distribution and the vector potential.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Abdullah H, El-Molla A, Salib FA, Allam NAT, Ghazy AA, Abdel-Shafy S. Morphological and molecular identification of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the camel tick *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) vectors of Rickettsioses in Egypt. Vet World. 2016;9(10):1087-1101.

Adamu M, Troskie M, Oshadu DO, Malatji DP, Penzhorn BL, Matjila PT. Occurrence of tick-transmitted pathogens in dogs in Jos, Plateau State, Nigeria. Parasit Vectors. 2014;7:119.

Ahmed BM, El-Hussein AM, El-Khider AO. Some observations on ticks (Acari: Ixodidae) infesting sheep in River Nile Province of Northern Sudan. Onderstepoort J Vet Res. 2005;72(3):239-243.

Arthur DR. Ticks in Egypt in 1500 B.C.?. Nature. 1965;206(988):1060-1061.

Baneth G, Samish M, Alekseev E, Aroch I, Shkap V. Transmission of *hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. J Parasitol. 2001;87(3):606-611.

Baneth G, Samish M, Shkap V. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). J Parasitol. 2007;93(2):283-299.

Beati L, Keirans JE. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. J Parasitol. 2001;87(1):32-48.

Beck S, Schreiber C, Schein E, Krucken J, Baldermann C, Pachnicke S, von Samson-Himmelstjerna G, Kohn B. Tick infestation and prophylaxis of dogs in northeastern Germany: a prospective study. Ticks Tick Borne Dis. 2014;5(3):336-342.

Bernasconi MV, Casati S, Peter O, Piffaretti JC. *Rhipicephalus* ticks infected with *Rickettsia* and *Coxiella* in Southern Switzerland (Canton Ticino). Infect Genet Evol. 2002;2(2):111-120.

Brianti E, Otranto D, Dantas-Torres F, Weigl S, Latrofa MS, Gaglio G, Napoli E, Brucato G, Cauquil L, Giannetto S, Bain O. *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodida, Ixodidae) as intermediate host of a canine neglected filarial species with dermal *microfilariae*. Vet Parasitol. 2012;183(3-4):330-7.

Burlini L, Teixeira KR, Szabo MP, Famadas KM. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? Exp Appl Acarol. 2010;50(4):361-374.

Bürger HJ, Eckert J, Kutzer E, Körting W, Rommel M, 2.4.1. Zecken und Milbenbefall (Acari). In: Schnieder T, Hrsg. Veterinärmedizinische Parasitologie Begründet von Josef Boch und Rudolf Supperer Thomas Schnieder. 6. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006. 236-244; 524-532.

Camicas JL. Les tiques du monde (Acarida, Ixodida) nomenclature, stades décrits, hôtes, répartition ; (espèces décrites avant le 1.01.96) The ticks of the world (Acarida, Ixodida). Paris, ORSTOM.1998.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 1984, Arbovirus catalog, Virus name: Koutango vom 17.11.1984 (zitiert vom 27.04.2017), <https://wwwn.cdc.gov/arbocat/VirusDetails.aspx?ID=246>.

Changbunjong T, Buddhirongawat R, Suwanpakdee S, Siengsanon J, Yongyuttawichai P, Cheewajorn K, Jangjaras J, Sangloun C, Ratanakorn P. A survey of ectoparasitic arthropods on domestic animals in Tak Province, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2009;40(3):435-442.

Chao LL, Liao HT, Ho TY, Shih CM. First detection and molecular identification of *Babesia gibsoni* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. Acta Tropica. 2017;166:356-362.

Cicuttin GL, Brambati DF, Rodriguez Eugui JJ, Lebrero CG, De Salvo MN, Beltran FJ, Gury Dohmen FE, Jado I, Anda P. Molecular characterization of *Rickettsia massiliae* and *Anaplasma platys* infecting *Rhipicephalus sanguineus* ticks and domestic dogs, Buenos Aires (Argentina). Ticks Tick Borne Dis. 2014; 5(5):484-488.

Cicuttin GL, Tarragona EL, De Salvo MN, Mangold AJ, Nava S. Infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) from Argentina. Ticks Tick Borne Dis. 2015;6(6):724-729.

Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M, Genaro O, Linardi PM. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. Vet Parasitol. 2005;128(1-2):149-155.

Dantas-Torres F. Rocky Mountain spotted fever. Lancet Infect Dis. 2007;7(11):724-732.

Dantas-Torres F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. Vet Parasitol. 2008;152(3-4):173-185.

Dantas-Torres F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Parasit Vectors. 2010;3:26.

Dantas-Torres F, Latrofa MS, Annoscia G, Giannelli A, Parisi A, Otranto D. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. Parasit Vectors. 2013;6:213.

Dantas-Torres F, Lorusso V, Testini G, de Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Stanneck D, Mencke N, Brandao-Filho SP, Alves LC, Otranto D. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. Parasitol Res. 2010;106(4):857-860.

De Oliveira PR, Bechara GH, Denardi SE, Saito KC, Nunes ET, Szabo MP, Mathias MI. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. Vet Parasitol. 2005;129(1-2):139-147.

- Demma LJ, Traeger MS, Nicholson WL, Paddock CD, Blau DM, Eremeeva ME, Dasch GA, Levin ML, Singleton Jr. J, Zaki SR, Cheek JE, Swerdlow DL, McQuiston JH. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *N Engl J Med*. 2005;353(6):587-594.
- Dioli M, Fox MT. First record of the camel tick *Rhipicephalus muhsamae* in Kenya on a one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Vet Rec*. 2004;155(7):206-208.
- Dobler G, Wölfel R. Fleckfieber und andere Rickettsiosen: Alte und neu auftretende Infektionen in Deutschland. *Dtsch Arztebl International*. 2009;106(20):348-354.
- Dobson SJ, Barker SC. Phylogeny of the hard ticks (Ixodidae) inferred from 18S rRNA indicates that the genus *Aponomma* is paraphyletic. *Mol Phylogenet Evol*. 1999;11(2):288-295.
- Dongus H, Zahler M, Gothe R. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodidae), in Germany: an epidemiologic study and control measures. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 1996;109(6-7):245-248.
- Dupont HT, Cornet JP, Raoult D. Identification of rickettsiae from ticks collected in the Central African Republic using the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1994;50(3):373-380.
- Eckert J, Friedhoff KT, Zahner H, Deplazes P, 3.5.1. Unterstamm Amandibulata. In: *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*, 2. Aufl., Stuttgart: Enke, 2008.375-396.
- El Kammah KM, Oyoun LM, El Kady GA, Shafy SA. Investigation of blood parasites in livestock infested with argasid and ixodid ticks in Egypt. *J Egypt Soc Parasitol*. 2001;31(2):365-371.
- ElGhali AA, Hassan SM. Ticks infesting animals in the Sudan and southern Sudan: Past and current status. *Onderstepoort J Vet Res*. 2012;76(2):177-185.
- Eremeeva ME, Bosserman EA, Demma LJ, Zambrano ML, Blau DM, Dasch GA. Isolation and identification of *Rickettsia massiliae* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks collected in Arizona. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(8):5569-5577.
- Eremeeva ME, Zambrano ML, Anaya L, Beati L, Karpathy SE, Santos-Silva MM, Salceda B, MacBeth D, Olguin H, Dasch GA, Aranda CA. *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus* ticks, Mexicali, Mexico. *J Med Entomol*. 2011;48(2):418-421.
- Feldman-Muhsam B. On the Identity of *Rhipicephalus sanguineus* Lat. *Bull Res Counc Isr*. 1952;2(2):187-194.
- Filippova NA. Fauna of Russia and neighbouring countries. Ixodid ticks of subfamily *Amblyomminae*; St Petersburg, Russia, "Nauka" Publishing House. 1997;4(5):436.
- Filippova NA, Panova IV. Importance of external ultrastructures for systematics of ixodid ticks of the genus *Rhipicephalus* Koch (Ixodoidea, Ixodidae). *Parazit Sborn Zool Inst Akad Nauk SSSR*. 1983;31:17-36.

- Fox MT, Sykes TJ. Establishment of the tropical dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*, in a house in London. *Vet Rec.* 1985;116(25):661-662.
- Goddard J. Focus of human parasitism by the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol.* 1989;26(6):628-629.
- Gothe R, Hamel HD. Epizootien von *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) in Deutschland. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1973;20(4):245-249.
- Gray J, Dantas-Torres F, Estrada-Pena A, Levin M. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013; 4(3):171-180.
- Greay TL, Oskam CL, Gofton AW, Rees RL, Ryan UM, Irwin PJ. A survey of ticks (Acari: Ixodidae) of companion animals in Australia. *Parasit Vectors.* 2016;9(1):207.
- Guglielmone AA, Nava S. Names for Ixodidae (Acari: Ixodoidea): valid, synonyms, incertae sedis, nomina dubia, nomina nuda, lapsus, incorrect and suppressed names-with notes on confusions and misidentifications. *Zootaxa.* 2014;3767:1-256.
- Hansford KM, Phipps LP, Cull B, Pietzsch ME, Medlock JM. *Rhipicephalus sanguineus*; importation into the UK: surveillance, risk, public health awareness and One Health response. *Vet Rec.* 2017;180(5):119.
- Haridy FM, Hassan AA, Hafez AO, El-Sherbini GT, Morsy TA. External and intestinal parasites of pet dogs with reference to zoonotic toxocariasis. *J Egypt Soc Parasitol.* 2009;39(1):321-326.
- Harrus S, Waner T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet J.* 2011;187(3):292-296.
- Hekimoglu O, Saglam IK, Ozer N, Estrada-Pena A. New molecular data shed light on the global phylogeny and species limits of the *Rhipicephalus sanguineus* complex. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7(5):798-807.
- Hoogstraal H. African Ixodoidea. Ticks of the Sudan (with special reference to Equatoria Province and with preliminary reviews of the genera *Boophilus*, *Margaropus*, and *Hyalomma*). Research report NM 050.29.07 of the Bureau of Medicine and Surgery 1. 1956.
- Hoogstraal H. Notes on African *Haemaphysalis* ticks. IV. Description of Egyptian populations of the yellow dog-tick, *H. leachii leachii* (Audouin, 1827) (Ixodoidea, Ixodidae). *J Parasitol.* 1958;44(5):548-558.
- Hoogstraal H, Kaiser MN. The Ticks (Ixodoidea) of Egypt. A brief review and keys. *J Egypt Public Health Assoc.* 1958;33(3):51-85.
- Hoogstraal H, Kaiser MN, Traylor MA, Gaber S, Guindy E. Ticks (Ixodoidea) on birds migrating from Africa to Europe and Asia. *Bull World Health Organ.* 1961;24:197-212.
- Hornok S, Sandor AD, Tomanovic S, Beck R, D'Amico G, Kotschan J, Takacs N, Gorfal T, Bendjeddou ML, Foldvari G, Farkas R. East and west separation of *Rhipicephalus sanguineus* mitochondrial lineages in the Mediterranean Basin. *Parasit Vectors.* 2017;10(1):39.

Iwakami S, Ichikawa Y, Inokuma H. A nationwide survey of ixodid tick species recovered from domestic dogs and cats in Japan in 2011. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014; 5(6):771-779.

Jaenson, TG, Talleklint L, Lundqvist L, Olsen B, Chiricov J, Mejlön H. Geographical distribution, host associations, and vector roles of ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) in Sweden. *J Med Entomol.* 1994;31(2):240-256.

Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology* 129 Suppl. 2004;3-14.

Kamani J, Baneth G, Mumcuoglu KY, Waziri NE, Eyal O, Guthmann Y, Harrus S. Molecular Detection and Characterization of Tick-borne Pathogens in Dogs and Ticks from Nigeria. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(3):2108.

Koch CL. Systematische Übersicht über die Ordnung der Zecken. *Archiv für Naturgeschichte.* Berlin. 1844;10:217-239.

Koch HG. Oviposition of the Brown Dog Tick (Acari: Ixodidae) in the Laboratory¹. *Ann Entomol Soc Am.* 1982;75(5):583-586.

Koch HG. Seasonal incidence and attachment sites of ticks (Acari: Ixodidae) on domestic dogs in southeastern Oklahoma and northwestern Arkansas, USA. *J Med Entomol.* 1982;19(3):293-298.

Latreille PA. *Genera crustaceorum et insectorum : secundum ordinem naturalem in familias disposita, iconibus exemplisque plurimis explicata* / P.A. Latreille. Argentorati: Amand Koenig, bibliopolam. 1806.

Latrofa MS, Dantas-Torres F, Annoscia G, Cantacessi C, Otranto D. Comparative analyses of mitochondrial and nuclear genetic markers for the molecular identification of *Rhipicephalus* spp. *Infect Genet Evol.* 2013;20:422-427.

Latrofa MS, Dantas-Torres F, Giannelli A, Otranto D. Molecular detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5(6):943-946.

Little SE, Hostetler J, Kocan KM. Movement of *Rhipicephalus sanguineus* adults between co-housed dogs during active feeding. *Vet Parasitol.* 2007;150(1-2):139-145.

Liu GH, Chen F, Chen YZ., Song HQ, Lin RQ, Zhou DH, Zhu XQ. Complete mitochondrial genome sequence data provides genetic evidence that the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) represents a species complex. *Int J Biol Sci.* 2013;9(4):361-369.

Loftis AD, Reeves WK, Szumlas DE, Abbassy MM, Helmy IM, Moriarity JR, Dasch GA. Rickettsial agents in Egyptian ticks collected from domestic animals. *Exp Appl Acarol.* 2006;40(1):67-81.

Lorusso V, Dantas-Torres F, Lia, RP, Tarallo VD, Mencke N, Capelli G, Otranto D. Seasonal dynamics of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*, on a confined dog population in Italy. *Med Vet Entomol.* 2010;24:309–315.

- Lucius R, Loos-Frank B. 8.2. Metastigmata (=Ixodida oder Ixodoidea). In: Biologie von Parasiten. 2. Aufl. Springer Berlin Heidelberg; 2008.431-437.
- Lv J, Wu S, Zhang Y, Chen Y, Feng C, Yuan X, Jia G, Deng J, Wang C, Wang Q, Mei L, Lin X. Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). Parasit Vectors. 2014;7:93.
- Mohammed MS, Hassan SM. Distribution and population dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) infesting sheep in Sennar State, Sudan. Onderstepoort J Vet Res. 2007;74(4):301-306.
- Monje LD, Linares MC, Beldomenico PM. Prevalence and infection intensity of *Rickettsia massiliae* in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks from Mendoza, Argentina. Microbes Infect. 2016;18(11):701-705.
- Moraes-Filho J, Krawczak FS, Costa FB, Soares JF, Labruna MB. Comparative Evaluation of the Vector Competence of Four South American Populations of the *Rhipicephalus sanguineus* Group for the Bacterium *Ehrlichia canis*, the Agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis. PLoS One. 2015;10(9):1-16.
- Moraes-Filho J, Marcili A, Nieri-Bastos FA, Richtzenhain LJ, Labruna MB. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. Acta Trop. 2011;117(1):51-55.
- Morel PC, Vassiliades G. Les Rhipicephalus du groupe sanguineus : espèces africaines (Acariens : Ixodoidea). Rev Elev Méd Vet Pays Trop. 1962;15(4):44.
- Morel PC, Vassiliades G. Description de *Rhipicephalus muhsamae* n.sp. de l'Ouest African (groupe de *Rh. simus*; Acariens, Ixodoidea). Rev Elev Méd Vet Pays Trop. 1965;17:619-636.
- Morel PC. Study on Ethiopian ticks (Acarida, Ixodida). Maisons-Alfort: Institut d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux. 1980;332.
- Moritz M, Fischer SC. Die typen der arachniden-sammlung des zoologischen Museums Berlin. IV. Ixodei." Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin. Zoologisches Museum und Institut für Spezielle Zoologie (Berlin). 1981;57(2):341-364.
- Murrell A, Campbell NJ, Barker SC. Mitochondrial 12S rDNA indicates that the *Rhipicephalinae* (Acari: Ixodida) is paraphyletic. Mol Phylogenet Evol. 1999;12(1):83-86.
- Nava S, Estrada-Pena A, Petney T, Beati L, Labruna MB, Szabo MP, Venzal JM, Mastropaolo M, Mangold AJ, Guglielmone AA. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). Vet Parasitol. 2015;208(1-2):2-8.
- Nava S, Guglielmone AA, Mangold AJ. An overview of systematics and evolution of ticks. Front Biosci (Landmark Ed). 2009;14:2857-2877.
- Nava S, Mastropaolo M, Venzal JM, Mangold AJ, Guglielmone AA. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. Vet Parasitol. 2012;190(3-4):547-555.

Neumann LG. Description d'une nouvelle espèce d'ixodiné. Bulletin du Muséum national d'histoire naturelle. 1908;352-355.

Neumann LG. Das Tierreich: Ixodidae. Berlin: R. Friedländer & Sohn, 1911;(26):169.

Nijhof AM, Guglielmone AA, Horak IG. TicksBase (version 5.6, Jun 2005). In: Roskov Y, Abucay L, Orrell T, Nicolson D, Bailly N, Kirk PM, Bourgoin T, DeWalt RE, Decock W, De Wever A, van Nieuwerkerken E, Zarucchi J, Penev L. eds. (2017). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 22nd March 2017. www.catalogueoflife.org/col. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. 2017, ISSN 2405-8858.

Nithikathkul C, Polseela R, Iamsa-ard J, Wongsawad C, Jittapalapong S. A study of ectoparasites of *Canis lupus familiaris* in Mueang district, Khon Kaen, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2005;36 Suppl 4:149-151.

Norris DE, Klompen JSH, Black WC. Comparison of the Mitochondrial 12S and 16S Ribosomal Dna Genes in Resolving Phylogenetic Relationships among Hard Ticks (Acari: Ixodidae). Ann Entomol Soc Am. 1999; 92(1):117-129.

Oscherov EB. Detection of *Anaplasma platys* and other pathogens in ectoparasites from urban hosts in Northeast Argentina. Revista Ibero-latinoamericana de parasitología. 2011;70(1):42-48.

Otranto D, Brianti E, Latrofa MS, Annoscia G, Weigl S, Lia RP, Gaglio G, Napoli E, Giannetto S, Papadopoulos E, Mirò G, Dantas-Torres F, Bain O. On a *Cercopithifilaria* sp. transmitted by *Rhipicephalus sanguineus*: a neglected, but widespread filarioid of dogs. Parasit Vectors. 2012;5(1):1.

Otranto D, Huchet JB, Giannelli A, Callou C, Dantas-Torres F. The enigma of the dog mummy from ancient Egypt and the origin of '*Rhipicephalus sanguineus*'. Parasit Vectors. 2014;7:2.

Pagel Van Zee J, Geraci NS, Guerrero FD, Wikel SK, Stuart JJ, Nene VM, Hill CA. Tick genomics: the Ixodes genome project and beyond. Int J Parasitol. 2007;37(12):1297-1305.

Parola P, Inokuma H, Camicas JL, Brouqui P, Raoult D. Detection and identification of spotted fever group *Rickettsiae* and *Ehrlichiae* in African ticks. Emerg Infect Dis. 2001;7(6):1014-1017.

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

Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. Clin Infect Dis. 2001;32(6):897-928.

Parola P, Socolovschi C, Jeanjean L, Bitam I, Fournier PE, Sotto A, Labauge P, Raoult D. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2(11):338.

- Pegram RG, Clifford CM, Walker JB, Keirans JE. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). I. *R. sulcatus* Neumann, 1908 and *R. turanicus* Pomerantsev, 1936. Syst Parasitol. 1987a;10(1):3-26.
- Pegram RG, Hoogstraal H, Wassef HY. Ticks (Acari: Ixodoidea) of Ethiopia. I. Distribution, ecology and host relationships of species infesting livestock. Bull Entomol Res. 1981;71(2):339-359.
- Pegram RG, Keirans JE, Clifford CM, Walker JB. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). II. *R. sanguineus* (Latreille, 1806) and related species. Syst Parasitol. 1987b;10(1):27-44.
- Pegram RG, Walker JB, Clifford CM, Keirans JE. Comparison of populations of the *Rhipicephalus simus* group: *R. simus*, *R. praetextatus*, and *R. muhsamae* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol. 1987c;24(6):666-682.
- Piranda EM, Faccini JL, Pinter A, Pacheco RC, Cancado PH, Labruna MB. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. Vector Borne Zoonotic Dis. 2011;11(1):29-36.
- Pomerantsev B, Matikashvily N, Lototsky B. An ecological and faunistic outline of Ixodidae ticks occurring in Transcaucasia. Parazitologicheskii Sbornik. 1940;7:100-133.
- Ramadan MY, Elakabawy LM, Elmadawy RS, Kamal MM. Prevalence of hard ticks infesting cattle with a special reference to microscopic and molecular early diagnosis of tick born piroplasms. Benha veterinary medical journal. 2016;30(2):51-60.
- Ramos RA, Giannelli A, Brianti E, Annoscia G, Cantacessi C, Dantas-Torres F, Otranto D. Tick vectors of *Cercopithifilaria baina* in dogs: *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato versus *Ixodes ricinus*. Parasitol Res. 2013;112(8):3013-3017.
- Ramos RA, Latrofa MS, Giannelli A, Lacasella V, Campbell BE, Dantas-Torres F, Otranto D. Detection of *Anaplasma platys* in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* group ticks by a quantitative real-time PCR. Vet Parasitol. 2014;205(1-2):285-288.
- Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 1997;10(4):694-719.
- Rapport Annuel de l'Institut Pasteur de Dakar (Senegal); World Health Organization, Center for Arbovirus Reference and Research, 1986.
- Rhodes AR, Norment BR. Hosts of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in northern Mississippi, USA. J Med Entomol. 1979;16(6):488-492.
- Roberts FHS. The taxonomic status of the species of the genera *Rhipicephalus* Koch and *Boophilus* Curtice (Acari : Ixodidae) occurring in Australia. Aust J Zool. 1965;13(3):491-523.
- Salih DA, Hassan SM, El Hussein AM, Jongejan F. Preliminary survey of ticks (Acari : Ixodidae) on cattle in northern Sudan. Onderstepoort J Vet Res. 2004;71(4):319-326.

- Sanches GS, Evora PM, Mangold AJ, Jittapalapong S, Rodriguez-Mallon A, Guzman PE, Bechara GH, Camargo-Mathias MI. Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). Vet Parasitol. 2016;215:78-87.
- Shao R, Barker SC. Mitochondrial genomes of parasitic arthropods: implications for studies of population genetics and evolution. Parasitology. 2007;134(2):153-167.
- Shoukry A, el-Kady GA, Merdan AI, el Said S. Distribution and host-relationship of ticks (Ixodoidea) infesting domestic animals and rodents in Sinai Peninsula. J Egypt Soc Parasitol. 1993;23(2):459-469.
- Solano-Gallego L, Rossi L, Scroccaro AM, Montarsi F, Caldin M, Furlanello T, Trotta M. Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. Parasit Vectors. 2012;5:98.
- Srivastava SC, Varma MGR. The Culture of the Tick *Rhipicephalus Sanguineus* (Latreille) (Ixodidae) in the Laboratory. J Med Entomol. 1964;1(2):154-157.
- Szabo MP, Mangold AJ, Joao CF, Bechara GH, Guglielmone AA. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. Vet Parasitol. 2005;130(1-2):131-140.
- Taylor MA, Coop RL, Wall RL. Facultative ectoparasites and arthropod vectors, In: Veterinary Parasitology, 3rd Edition, Chichester, West Sussex: Blackwell Publishing, 2007. 709-711.
- Teel PD, Bay DE, Ajidagba PA. Ecology, distribution and host relationships of ticks (Acari: Ixodidae) infesting livestock in Mali. Bull Entomol Res. 1988;78(3):407-427.
- Terenius O, Mejlon HA, Jaenson TG. New and earlier records of ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) from Guinea-Bissau. J Med Entomol. 2000;37(6):973-976.
- Uilenberg G. Babesia--a historical overview. Vet Parasitol. 2006;138(1-2):3-10.
- Walker AR, Bouattour A, Camicas JL, Estrada-Peña A, Horak IG, Latif AA, Pegram RG, Preston PM. Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. Edinburgh Scotland, U.K.: Bioscience Reports, 2003.
- Walker JB, Keirans JE, Horak IG. The Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae): A Guide to the Brown Ticks of the World, Cambridge University Press. 2000.
- Wiens JJ, Penkrot TA. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (Sceloporus). Syst Biol. 2002;51(1):69-91.
- Wölfel R, Essbauer S, Dobler G. Diagnostics of tick-borne rickettsioses in Germany: A modern concept for a neglected disease. Int J Med Microbiol. 2008;298, Supplement 1(0):368-374.

Zahler M, Filippova NA, Morel PC, Gothe R, Rinder H. Relationships between species of the *Rhipicephalus sanguineus* group: a molecular approach. J Parasitol. 1997;83(2): 302-306.

Zumpt F. Die Rhipicephalusarten der USSR, ein Beitrag zur Variabilität in der Sanguineusgruppe. Parasitol Res. 1939;11(2):400-409.

Zumpt F. Zur Kenntnis der ausserafrikanischen Rhipicephalusarten. Z Parasitenkd. 1940;11(5):669-678.

Zumpt, F. Die Hundezecke in Deutschland. Desinfekt. Schädlingsbekämpf. 1944;36:7-9.

Zumpt F. Preliminary Study to a Revision of the Genus Rhipicephalus Koch: Key to the Adult Ticks of the Genus Rhipicephalus Koch and Description of Two New Species, Reparticao Tecnica de Estatistica, Imprensa Nacional de Mocambique. 1950.

8 ANHANG

Tabelle 2: Zecken gesammelt von verschiedenen Wirtstieren, Luxor, Ägypten, 2013

Wirtstier, Rasse (Geschlecht/Alter ^a)	Lokalisation am Tier	Datum	Zeckenart	Anzahl Zecken		Vorstellungsgrund
				Männlich	Weiblich	
Pferd, Warmblut (m/k.A.)	Analregion	14.05.2013	<i>H. anatolicum</i>	7	1	Wundbehandlung
Hund, DSH (m/2)	Ohr	14.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	6	14	Zeckenbehandlung
Pferd, Warmblut (m/k.A.)	Analregion	15.05.2013	<i>H. anatolicum</i>	1	1	Wundbehandlung
Hund, Mischling (m/6 Mo.)	Ohr	16.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	17	33	Zeckenbehandlung
Hund, Mischling (w/1)	Ohr	18.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	14	16	Zeckenbehandlung, Diarrhoe
Hund, Mischling (m/6 Mo.)	Ohr	18.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	2	2	Beinamputation
Hund, Mischling (w/2)	Ohr	18.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	5	5	Zeckenbehandlung
Hund, DSH (m/1)	Ohr	18.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	0	5	Zeckenbehandlung
Hund, Mischling (m/2)	Ohr	18.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	0	5	Zeckenbehandlung
Hund, Mischling (w/3)	Ohr	18.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	2	4	Zeckenbehandlung
Hund, DSH (m/2)	Ohr	19.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	0	5	Zeckenbehandlung
Hund, Mischling (m/2)	Ohr	19.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	0	4	Zeckenbehandlung

Wirtstier, Rasse (Geschlecht/Alter ^a)	Lokalisation am Tier	Datum	Zeckenart	Anzahl Zecken		Vorstellungsgrund
				Männlich	Weiblich	
Katze, EKH (wk/3)	Seitliche Bauchwand	19.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	1	0	Sectio caesara
Hund, Mischling (w/4)	Ohr	19.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	18	71	Zeckenbehandlung
Hund, DSH (w/8 Mo.)	Ohr	20.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	1	4	Zeckenbehandlung
Hund, Mischling (m/6 Mo.)	Ohr	20.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	1	1	Zeckenbehandlung
Hund, Mischling (w/1)	Ohr	20.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	1	3	Kastration
Hund, Weimaraner (m/6 Mo.)	Ohr	21.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	6	23	Zeckenbehandlung
Hund, Mischling (m/6 Mo.)	Ohr	22.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	1	4	Zeckenbehandlung
Kamel, Dromedar (m/2)	Kopf	22.05.2013	<i>H. anatolicum</i>	0	1	Zeckenbehandlung
Kamel, Dromedar (m/5)	Kopf	22.05.2013	<i>H. anatolicum</i>	0	1	Zeckenbehandlung
Katze, EKH (m/1)	Seitliche Bauchwand	24.05.2013	<i>Haemaphysalis</i> sp.	0	1	Femurfraktur
			<i>R. sanguineus</i> s.l.	0	1	
Esel, Hausesel (w/2 Mo.)	Hals	24.05.2013	<i>R. annulatus</i>	0	2	Flaschenaufzucht
Katze, EKH (m/1)	Seitliche Bauchwand	25.05.2013	<i>Haemaphysalis</i> sp.	0	1	Gesund

Wirtstier, Rasse (Geschlecht/Alter ^{a)})	Lokalisation am Tier	Datum	Zeckenart	Anzahl Zecken		Vorstellungsgrund
				Männlich	Weiblich	
Hund, Mischling (w/2)	Ohr	25.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	5	1	Diarrhoe, Vomitus (VD: Parvovirose)
Hund, Mischling (m/3)	Ohr / Achsel	26.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	30	44	Zeckenbehandlung
Hund, Labrador (w/3 Mo.)	Kopf, Rumpf	26.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	4	6	Zeckenbehandlung
Hund, Labrador (m/2 Wo.)	Ohr	27.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	2	2	Zeckenbehandlung
Hund, Staffordshire Bullterrier (m/2)	Ohr	28.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	2	2	Cherry Eye
Hund, Mischling (w/1)	Ohr	28.05.2013	<i>R. muhsamae</i>	0	1	Seilverletzung
Hund, DSH (w/3 Mo.)	Rücken	28.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	10	15	Zeckenbehandlung
Katze, EKH (mk/12)	Seitliche Bauchwand	29.05.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	0	1	Zeckenbehandlung
Esel, Hausesel (w/3 Wo.)	Nacken	31.05.2013	<i>R. annulatus</i>	0	11	Zeckenbehandlung
Esel, Hausesel (w/4)	Hals, Brust	31.05.2013	<i>R. annulatus</i>	3	15	Bisswunde
			<i>H. anatolicum</i>	0	2	
Hund, Labrador (m/3 Wo.)	Achsel	01.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	1	0	Gesund

Wirtstier, Rasse (Geschlecht/Alter ^{a)})	Lokalisation am Tier	Datum	Zeckenart	Anzahl Zecken		Vorstellungsgrund
				Männlich	Weiblich	
Hund, Labrador (m/3 Wo.)	Ohr	01.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	2	3	Otitis
Hund, Mischling (m/1)	Kopf	01.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	4	1	Zeckenbehandlung
Hund, DSH Mischling (m/7 Wo.)	Ohr	03.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	10	15	Zeckenbehandlung
Hund, Mischling (m/1)	Kopf	04.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	1	1	Zeckenbehandlung
Hund, Mischling (m/2)	Nacken	06.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	3	1	Fellpflege
Hund, Mischling (m/5)	Nacken	06.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	19	24	Zeckenbehandlung
Hund, Mischling (w/5)	Kopf, Rücken	08.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	22	8	Zeckenbehandlung
Hund, DSH Mischling (m/1)	Kehle	08.06.2013	<i>R. muhsamae</i>	0	1	Gesund
Hund, DSH (m/4 Mo.)	Ohr, Rücken	08.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	29	15	Zeckenbehandlung
Hund, Mischling (m/2 Mo.)	Pfote, Schulter	09.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	4	4	Gesund
			<i>R. muhsamae</i>	1	0	
Hund, Mischling (m/1 Mo.)	Ohr	09.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	5	2	Vomitus, Fieber (VD: Parvovirose)

Wirtstier, Rasse (Geschlecht/Alter ^{a)})	Lokalisation am Tier	Datum	Zeckenart	Anzahl Zecken		Vorstellungsgrund
				Männlich	Weiblich	
Hund, DSH (w/5 Mo.)	Kopf, Rumpf	10.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	0	39	Zeckenbehandlung
Hund, DSH (m/5 Mo.)	Hals	10.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	0	9 Nymphen	Zeckenbehandlung
Hund, DSH (m/3 Mo.)	Kopf, Schulter	11.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	22	23	Zeckenbehandlung
Hund, DSH Mischling (m/8 Wo.)	Ohr, Achsel	13.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	10	12	Zeckenbehandlung
Hund, DSH Mischling (m/8 Wo.)	Ohr	13.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	3	5	Zeckenbehandlung
Pferd, Warmblut (m/k.A.)	Hals	14.06.2013	<i>R. annulatus</i>	0	3	Wunde
Hund, Mischling (m/k.A.)	Ganzkörper	25.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	22	14 + 4 Nymphen	Anämie, Zeckenbehandlung
Hund, Mischling (m/2 Wo.)	Ohr	26.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	2	1	Zeckenbehandlung
Hund, DSH Mischling (m/1)	Auge, Ohr, Brust	27.06.2013	<i>R. muhsamae</i>	2	2	Zeckenbehandlung
Hund, Mischling (w/4)	Ganzkörper	27.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	2	6 Nymphen	Zeckenbehandlung
Hund, Labrador (m/3 Wo.)	Ohr	27.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	5	0	Zeckenbehandlung

Wirtstier, Rasse (Geschlecht/Alter ^a)	Lokalisation am Tier	Datum	Zeckenart	Anzahl Zecken		Vorstellungsgrund
				Männlich	Weiblich	
Pferd, Warmblut (m/k.A.)	Hals, Kehle, Schweif	27.06.2013	<i>H. anatolicum</i>	0	1	Zeckenbehandlung, Alopezie
			<i>R. muhsamae</i>	12	6	
Hund, Mischling (m/2)	Kopf	29.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	6	10	Zeckenbehandlung
Hund, Mischling (m/2)	Kopf	29.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l..	6	9	Zeckenbehandlung
Hund, Mischling (w/k.A.)	Ohr, Nacken	30.06.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l..	7	4	Bisswunden
Katze, EKH (mk/3)	Schulter	01.07.2013	<i>Haemaphysalis</i> sp.	0	1	Zeckenbehandlung
Hund, DSH (m/6 Mo.)	Kopf	01.07.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l..	0	1	Lahmheit Ellbogen
Hund, DSH (m/1)	Rücken	01.07.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l..	11	22	Zeckenbehandlung
Hund, Deutsche Dogge (m/6 Wo.)	Ohr	02.07.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l..	1	0	Zeckenbehandlung
Hund, Mischling (w/3)	Ohr, Hals, Pfote	04.07.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	11	13	Zeckenbehandlung
Katze, EKH (w/4)	Schulter	05.07.2013	<i>Haemaphysalis</i> sp.	1	0	Zeckenbehandlung
Hund, Labrador Mischling (m/k.A.)	Ohr	05.07.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	4	6	Fraktur, Euthanasie

Wirtstier, Rasse (Geschlecht/Alter ^a)	Lokalisation am Tier	Datum	Zeckenart	Anzahl Zecken		Vorstellungsgrund
				Männlich	Weiblich	
Hund, Mischling (w/k.A.)	Ohr	06.07.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	14	6	Zeckenbehandlung
Esel, Hausesel (m/4 Mo.)	Kopf, Schulter, Schwanz	08.07.2013	<i>R. annulatus</i>	17	14	Zeckenbehandlung, Kachexie
Hund, Mischling (m/2)	Kopf, Schulter	08.07.2013	<i>R. sanguineus</i> s.l.	4	7	Zeckenbehandlung
Esel, Hausesel (m/k.A.)	Brust	11.07.2013	<i>R. annulatus</i>	1	1	Anämie
Pferd, Warmblut (m/4 Mo.)	Nacken, Hintergliedmaße	11.07.2013	<i>R. annulatus</i>	16	4	Zeckenbehandlung
Hund, Mischling (w/3)	Bauch	11.07.2013	<i>R. muhsamae</i>	1	2	Gesund
Esel, Hausesel (w/3 Mo.)	Ohr, Nacken	12.07.2013	<i>R. annulatus</i>	6	9	Zeckenbehandlung

^a Alter in Jahren; Mo.= Monat; Wo.= Woche; k.A. = keine Angabe; w= weiblich; m= männlich; mk= männlich, kastriert; wk= weiblich kastriert;
R.= *Rhipicephalus*; *H.*=*Hyalomma*, DSH= Deutscher Schäferhund; EKH= Europäisch Kurzhaar, VD=Verdachtsdiagnose; sp.= species; s.l.=sensu lato

9 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Martin Pfeffer für die Bereitstellung des Themas, seine unendliche Geduld und immer herzliche, fachlich höchst kompetente Betreuung bei der Entstehung meiner Doktorarbeit. Ich weiß sehr zu schätzen, wie schnell und detailliert ich auf all meine Fragen und Manuskripte eine Antwort bekommen habe. Außerdem danken möchte ich den Mitarbeitern des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, insbesondere Frau Dr. Anna Obiegala für die herzliche Aufnahme und Beratung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Dobler und den Mitarbeitern der TE 020 bzw. KB 2 des Instituts für Mikrobiologie der Bundeswehr der Sanitätsakademie München für die Möglichkeit meine Laborarbeiten anzufertigen. Vielen Dank an Dr. Mandy Knüpfer, Dr. Silke Wölfel, Claudia Kahlhofer, Melanie Nurtsch, Karolin Guckau, Daniela Friese, Josua Zinner und Juliane Nolte für eure Hilfsbereitschaft innerhalb und außerhalb des Labors und eure wunderbare Freundschaft.

Mein Dank gilt auch meinen Coautoren Frau Lidia Chitima-Dobler und Herrn Santiago Nava für die immer konstruktive und sehr angenehme Zusammenarbeit bei der Entstehung der Veröffentlichungen.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Hilfe und Unterstützung meiner ägyptischen Kollegen in der Tierklinik Animal Care in Egypt in Luxor. Vielen Dank für die sprachliche Unterstützung bei der Sammlung des Probenmaterials und das große Verständnis für diesen etwas ungewöhnlichen Plan im Rahmen eines Praktikums. Meiner liebsten Tanja möchte ich danken, dass sie mich trotz hoher Risiken mitsamt meinen Zecken aus Ägypten abgeholt hat und einfach unerschütterlich an meiner Seite steht.

Last but not least möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und meinem Partner bedanken. Ohne die unermüdliche, liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen und Launen, wäre diese Dissertation wohl nie zu einem Ende gekommen. Zu guter Letzt möchte ich meinem Opa Dr. Albert Rapp danken, der all seine Hoffnung in eine Nachwuchsdoktorin in seiner Familie gesetzt hat und mich mit diesem Wunsch motiviert hat sowie meinem Papa Dr. Frank Langguth, für den harten Titelkampf. Ich habe Dich mit Freuden gewinnen lassen.