

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Reinhard K. Straubinger, Ph. D.

**Entwicklung eines auf DNA-Mikroarray basierenden Verfahrens  
zum schnellen und hochsensitiven Nachweis von durch Zecken  
übertragenen Pathogenen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Christine Anette Shao-Minh Geiger  
aus Erlangen

München 2012

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Straubinger

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Pfister  
Univ.-Prof. Dr. Wolf  
Univ.-Prof. Dr. Potschka  
Priv.-Doz. Dr. Herbach

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

Meinen Eltern



**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1</b>	<b>Auswahl relevanter, zu detektierender Pathogene.....</b>	<b>3</b>
1.1	Wichtige Pathogene mit <i>Ixodes ricinus</i> als Vektor .....	5
1.2	Wichtige Pathogene mit <i>Dermacentor reticulatus</i> als Vektor.....	10
1.3	Wichtige Pathogene mit <i>Rhipicephalus sanguineus</i> als Vektor .....	11
<b>2</b>	<b>Koinfektionen und Persistenz.....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Bisherige diagnostische Möglichkeiten.....</b>	<b>17</b>
3.1	Serologie.....	18
3.2	Mikroskopie.....	19
3.3	Kultur.....	20
3.4	Konventionelle und real-time-quantitative PCR .....	20
3.5	Next Generation Sequencing (NGS) .....	21
<b>4</b>	<b>DNA-Mikroarray/Gene-Chip.....</b>	<b>22</b>
4.1	Allgemeiner Aufbau und Sondendesign des DNA-Mikroarrays.....	22
4.2	DNA-Mikroarray ArrayTube™ (Alere Technologies GmbH) .....	25
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>29</b>
<b>1</b>	<b>Material .....</b>	<b>29</b>
1.1	Reagenzien und weitere Materialien .....	29
1.2	Probenmaterial.....	29
1.2.1	Positivkontrollen für den Mikroarray .....	29
1.2.2	Proben zum Test der Spezifität.....	30
1.2.3	Feldproben.....	30
<b>2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>31</b>
2.1	DNA-Extraktion .....	31
2.2	Auswahl der Zielgene und Primerdesign für die Multiplex-PCR .....	31
2.3	Design der DNA-Sonden für den Mikroarray .....	34
2.4	Klonierung und Sequenzierung .....	38
2.4.1	Herstellung kompetenter Zellen .....	38
2.4.2	Herstellung des pBSK-Vektors .....	38
2.4.3	Herstellung der Positivkontrollen.....	40
<b>3</b>	<b>Etablierung der Multiplex-PCR-Methode .....</b>	<b>42</b>

---

<b>4</b>	<b>Hybridisierungsprotokoll und Mikroarray-Analyse.....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>Sensitivitätsmessung und Festlegung des Cut-offs für die Sonden .....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>Analyse der Spezifität des Mikroarrays .....</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>Analyse der Feldproben .....</b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>Analyse unspezifischer Signale in den Feldproben .....</b>	<b>46</b>
8.1	Real-time PCR.....	47
8.2	Untersuchung mittels Mikroarray.....	47
8.3	Multiplex-PCR und Sequenzierung.....	47
8.4	PCR der 16S rRNA und Sequenzierung.....	48
8.5	Klonierung und Sequenzierung .....	48
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>49</b>
<b>1</b>	<b>Multiplex-PCR.....</b>	<b>49</b>
<b>2</b>	<b>Mikroarray-Analyse.....</b>	<b>50</b>
<b>3</b>	<b>Sensitivität und Festlegung des Cut-offs der Sonden.....</b>	<b>54</b>
<b>4</b>	<b>Analyse der Spezifität.....</b>	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse der Analysen der Feldproben .....</b>	<b>63</b>
5.1	Ergebnisse der <i>Ixodes-ricinus</i> -Feldproben .....	63
5.2	Ergebnisse der <i>Dermacentor-reticulatus</i> -Feldproben .....	64
<b>6</b>	<b>Analyse unspezifischer Signale in den Feldproben .....</b>	<b>64</b>
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>67</b>
<b>1</b>	<b>Ergebnisse der Untersuchung von Feldproben .....</b>	<b>67</b>
<b>2</b>	<b>Analyse unspezifischer Signale in den Feldproben .....</b>	<b>69</b>
<b>3</b>	<b>Multiplex-PCR.....</b>	<b>72</b>
<b>4</b>	<b>Mikroarray.....</b>	<b>73</b>
<b>5</b>	<b>Sensitivität .....</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>Spezifität.....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>79</b>
7.1	Optimierung des Mikroarrays.....	79
7.2	Erweiterung des Mikroarray-Designs.....	80
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>83</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>85</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>87</b>

---

<b>IX. ANHANG .....</b>	<b>107</b>
<b>X. DANKSAGUNGEN.....</b>	<b>134</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Amp	Ampicillin
<i>ankA</i>	Ankyrin-repeat protein
Aqua dest.	Aqua destillata
bp	Basenpaar(e)
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
<i>Cand.</i>	„ <i>Candidatus</i> “: noch nicht kultivierbares Bakterium
<i>cf.</i>	“ <i>confer</i> “: vergleiche/vergleichbar
C <sub>t</sub>	threshold cycle
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic-acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FAM	6-Carboxyfluorescein
g	Gramm
<i>gltA</i>	Citrate-Synthase Gen
<i>groESL</i>	Hitzeschockprotein
<i>gyrB</i>	gyrase subunit beta
HRP	horseradish peroxidase
h	Stunde(n)
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-Galaktopyranoside
LB	lysogeny broth
M	Mol
min	Minuten
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
<i>msp2</i>	major surface protein 2
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte



<i>ompB</i>	outer membrane protein B
<i>ospA</i>	outer surface protein A
<i>p41</i>	protein 41
<i>p44</i>	outer membrane protein 44
PCR	polymerase chain reaction
pH	pH-Wert
ROX	X-Rhodamin (reference dye)
rpm	revolutions per minute
rRNA	ribosomale RNA
Salp	salivary gland protein
sek	Sekunden
SI	Signalintensität
SOB	super optimal broth
SOC	super optimal broth with catabolite repression
sp.	eine einzelne Spezies
spp.	mehrere Spezies
TAE	Tris/Acetat/EDTA Elektrophorese-Puffer
TAMRA	Carboxy-Tetramethylrhodamin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris/EDTA-Puffer
Th1 und 2	T-Helferzellen 1 und 2 (Untergruppe der CD4-T-Zellen)
TMB	tetramethylbenzidine
Tris·Cl	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Tris-HCL	Tris-hydrochlorid
VlsE	variable major protein like sequence-expressed
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktopyranoside

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Modell der Immunpathogenese von durch Zecken .....	4
Abbildung 2: Allgemeines Diagnostikschema für rickettsiale Erreger .....	18
Abbildung 3: Schema von Mikroarrayaufbau und Hybridisierungsreaktion .....	24
Abbildung 4: ArrayTube™ .....	25
Abbildung 5: Mikroarray-Analyse .....	26
Abbildung 6: Auswertung des Mikroarrays und Analyse mittels Diagramm .....	28
Abbildung 7: Schema des Sonden- und Primerdesigns.....	32
Abbildung 8: 1 %iges Agarosegel des aufgereinigten pBSK-Vektors.....	39
Abbildung 9: 3 %iges Agarosegel mit Produkten aus der Multiplex-PCR.....	49
Abbildung 10: Mikroarray des PCR-Produkts von <i>B. garinii</i> ( <i>Bbav</i> ).....	51
Abbildung 11: Mikroarray des PCR-Produkts von <i>B. afzelii</i> und <i>Ap</i> .....	53
Abbildung 12: Mikroarray des PCR-Produkts von <i>B. afzelii</i> , <i>Bbss</i> , <i>Rh</i> und <i>Ap</i> .....	54
Abbildung 13: Agarosegel der <i>Anaplasma-platys</i> -Verdünnungsreihe.....	55
Abbildung 14: Mikroarrays der <i>Anaplasma-platys</i> -Verdünnungsreihe .....	56
Abbildung 15: Mikroarray der PCR-Produkte von <i>Rickettsia honei</i> .....	58
Abbildung 16: Mikroarray der PCR-Produkte von <i>Rickettsia monacensis</i> .....	59
Abbildung 17: Mikroarray der PCR-Produkte von <i>Borrelia spielmanii</i> .....	60
Abbildung 18: Mikroarray der PCR-Produkte von <i>Babesia microti</i> -like.....	61
Abbildung 19: Mikroarray der PCR-Produkte von <i>Anaplasma marginale</i> .....	62
Abbildung 20: Mikroarray einer Probe von <i>D. reticulatus</i> .....	65
Abbildung 21: Elektronenmikroskopie von <i>Cand. Midichloria mitochondrii</i> .....	71
Abbildung 22: Mikroarray-Analysen mit den <i>Rh</i> -Positivkontrollen.....	78

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS ANHANG

Abbildung A 1: Layout DNA-Mikroarray.....	130
Abbildung A 2: Charakterisierung der unspezifischen Bande von <i>D. reticulatus</i> .....	131
Abbildung A 3: Charakterisierung der unspezifischen Bande von <i>I. ricinus</i> .....	132

## **TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Primer für die Multiplex-PCR.....	33
Tabelle 2: Sondensequenzen des entwickelten DNA-Mikroarrays.....	35
Tabelle 3: Multiplex-PCR, Reaktionsansatz .....	42
Tabelle 4: PCR-Protokoll Multiplex-PCR.....	42
Tabelle 5: Hybridisierungsprotokoll Mikroarray .....	43
Tabelle 6: Berechnung der Kopienanzahl der Positivkontrollen.....	45
Tabelle 7: Vergleich der Sensitivität von Agarosegel und Mikroarray.....	57
Tabelle 8: Vergleich DNA-Mikroarray zu <i>ospA</i> real-time PCR .....	63
Tabelle 9: Koinfektionen in <i>I. ricinus</i> detektiert mittels Mikroarray .....	64
Tabelle 10: Ausschnitt aus den Analysen durchgeführt bei Alere Technologies.....	74

## **TABELLENVERZEICHNIS ANHANG**

Tabelle A 1: Puffer und Lösungen .....	107
Tabelle A 2: Reagenzien und Chemikalien .....	109
Tabelle A 3: Enzyme .....	112
Tabelle A 4: Kommerzielle Testsysteme.....	112
Tabelle A 5: Weitere Materialien .....	113
Tabelle A 6: Geräte.....	113
Tabelle A 7: Verwendete Programme .....	114
Tabelle A 8: Verwendete Sequenzen (PubMed NCBI GenBank).....	115
Tabelle A 9: Übersicht der ausgewählten Pathogene .....	124
Tabelle A 10: Ausschnitte aus den Matchtabellen .....	125

## I. EINLEITUNG

Zecken verschiedener Spezies dienen als Vektoren für diverse Pathogene, welche bei Menschen und Tieren Erkrankungen verursachen können. Zu den relevanten, von Zecken übertragenen Pathogenen gehören in Europa unter anderem *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia gibsoni*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia conorii* und die Mitglieder der *Borrelia-burgdorferi*-sensu lato-Gruppe. Als Erreger der Lyme-Borreliose (LB) sind dabei *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto von Bedeutung. Die Pathogene zeigen ein unterschiedliches Verhalten hinsichtlich ihrer Reservoirwirte und ihrer regionalen Verbreitung. Vor allem aufgrund von Reiseaktivitäten und dem Import von Hunden müssen Pathogene, die für eine Region eigentlich als nicht endemisch bekannt sind, als verursachendes Agens einer entsprechenden Erkrankung berücksichtigt werden. Diese Pathogene können sich ebenso in einem Gebiet etablieren und endemisch werden, wenn lokal bereits ein kompetenter Vektor vorhanden ist (HAMEL et al., 2011; OTRANTO et al., 2010). In diesem Fall können solche Erreger einen unvorhersehbaren Risikofaktor für Mensch und Tier darstellen, welche sich noch nicht mit dem Erreger auseinandergesetzt haben und bei Auftreten einer klinischen Erkrankung keine spezifische Diagnostik erfolgt. Koinfektionen von Zecken, aber auch die gleichzeitigen Übertragung mehrerer Pathogene auf einen Wirt sind möglich (BOWMAN et al., 2009; HILDEBRANDT et al., 2011a; KORDICK et al., 1999; RYMASZEWSKA et al., 2011). Dabei kann eine simultane Infektion mit mehreren von Zecken übertragenen Erregern zu einer Verstärkung und Persistenz klinischer Symptome führen, wie es beispielsweise bei Mehrfachinfektionen mit *Borrelia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. oder *Ehrlichia canis* beschrieben wurde (BEALL et al., 2008; DUMLER et al., 2005; GAUNT et al., 2010; KORDICK et al., 1999; KRAUSE et al., 1996; KRAUSE et al., 2002). Jedoch ist der gegenseitige Einfluss multipler Infektionen auf den Verlauf einer Erkrankung häufig noch unklar und wenig charakterisiert. Diese Situation beruht unter anderem auf der Verfügbarkeit von Nachweismethoden, die lediglich einzelne Erreger detektieren, und den dadurch entstehenden hohen Kosten bei der Diagnostik multipler Pathogene. Zusätzlich vorhandene Erreger werden deshalb häufig nicht diagnostiziert. Außerdem lassen sich viele Erkrankungen mit dem gleichen antibiotischen Wirkstoff therapieren, wie zum Beispiel mit Doxycyclin bei klinischen Veränderungen verursacht durch *Borrelia* spp., *Anaplasma phagocytophilum* und *Ehrlichia canis* (EDDLESTONE et al., 2007a; KRUPKA et al.,

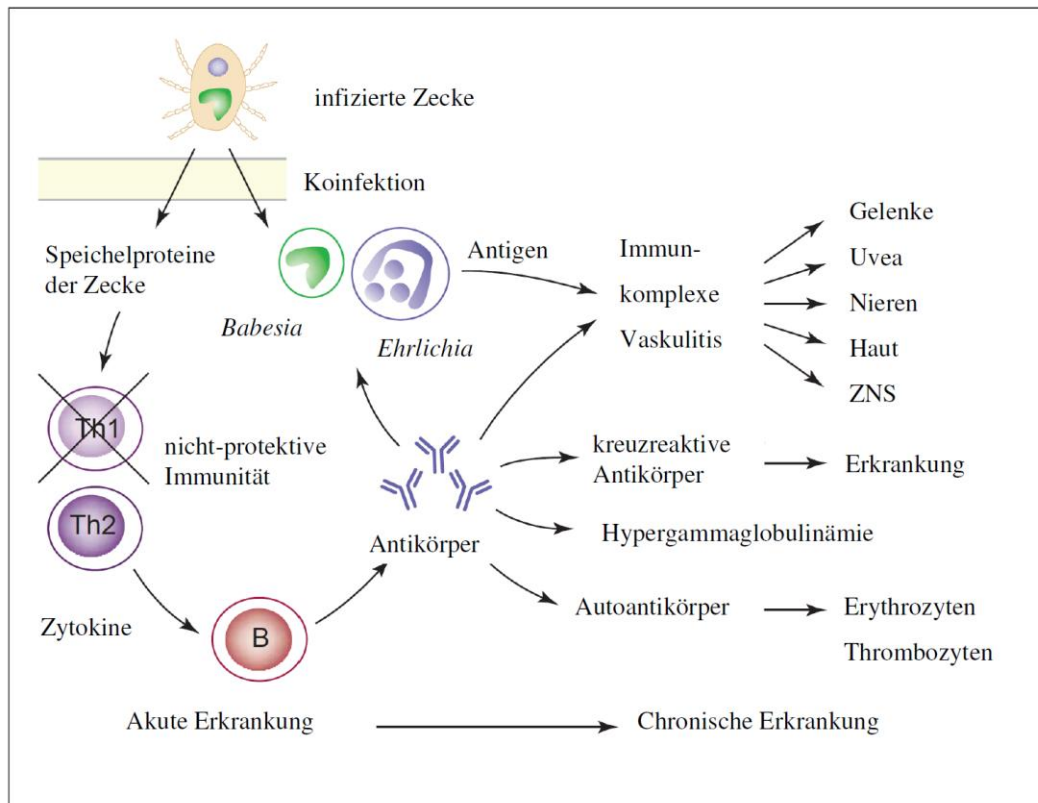
2010). Bei Ansprechen der Therapie und Besserung des Allgemeinbefindens des Patienten wird deshalb häufig keine zusätzliche Diagnostik auf weitere Infektionserreger betrieben. Aufgrund der oben beschriebenen Problematik war das Ziel dieser Arbeit, ein Analyseverfahren zum gleichzeitigen Nachweis multipler, von Zecken übertragener Pathogene zu entwickeln. Dabei wurde auf einen DNA-Mikroarray (ArrayTube™, Alere Technologies GmbH) zurückgegriffen. Dieser stellt ein hochspezifisches und –sensitives Nachweisverfahren dar, das bereits für die Detektion und Charakterisierung von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Chlamydia* spp. und *Escherichia coli* entwickelt wurde (ANJUM et al., 2007; BOREL et al., 2008; EHRICHT et al., 2006; MONECKE et al., 2005).

Der in dieser Arbeit entwickelte DNA-Mikroarray ermöglicht den spezifischen und sensitiven Nachweis multipler Pathogene und Koinfektionen und ist daher für den künftigen Einsatz in der Forschung und für die klinische Diagnostik konzipiert.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1 Auswahl relevanter, zu detektierender Pathogene

Durch Vektoren übertragene Pathogene spielen nicht nur wegen ihres Einflusses auf die Gesundheit von Hunden eine große Rolle, sondern auch wegen der Möglichkeit, diese als Reservoirwirte zu nutzen und so ein Risiko für Infektionen des Menschen darzustellen (DAY, 2011). Häufig ist noch nicht genauer bekannt, wie sich mehrere Erreger bei einer Infektion gegenseitig beeinflussen. In der Literatur wird oft ein synergistischer Einfluss bei Koinfektionen beschrieben (CARRADE et al., 2009). Studien zufolge ist bei der Pathogenese der übertragenen Erreger zudem der Einfluss der Vektorzecke auf die Entwicklung der Infektion und die Immunabwehr des Wirtes relevant, da nicht nur eine Erregertransmission stattfindet, sondern auch Speichelproteine injiziert werden, welche die Immunantwort modulieren (Abbildung 1). Dabei wird insbesondere die über T-Helferzellen 1 (Th1) regulierte zelluläre Immunantwort gehemmt, während die über T-Helferzellen 2 (Th2) regulierte humorale Abwehr stimuliert wird. Das fördert zum einen initial das Überleben und die Vermehrung der Pathogene im Wirt. Zum anderen wird auch, bedingt durch die gesteigerte humorale Abwehr, eine sekundäre Immunpathologie angeregt, die mit Hypergammaglobulinämie, der Bildung von Immunkomplexen und Autoantikörpern einhergeht und eine Verschlimmerung der Symptomatik hervorrufen kann (DAY, 2011; SHAW et al., 2001).



**Abbildung 1: Modell der Immunpathogenese von durch Zecken übertragenen Erregern in Hunden**

modifiziert nach Shaw et al. (SHAW et al., 2001)

Zecken zählen zu den Vektoren, die einige der wichtigsten krankheitserregenden Pathogene auf Menschen und Tiere übertragen können. Für drei der wichtigsten Zeckenarten in Europa, *Ixodes (I.) ricinus*, *Dermacentor (D.) reticulatus* und *Rhipicephalus (R.) sanguineus*, konnte in früheren Studien eine Ausbreitung in bisher nicht endemische Regionen und damit eine Verbreitung der von ihnen übertragenen Erreger beobachtet werden. *R.-sanguineus*-Zecken, die in Europa hauptsächlich in der Mittelmeerregion gefunden wurde, konnte sich bereits weiter nach Westeuropa und nach Belgien, Frankreich, Deutschland und in die Niederlande ausbreiten (BEUGNET et al., 2009; BEUGNET et al., 2011; CACCIO et al., 2002). In diesen Gebieten ist die Überwinterung außerhalb von Häusern und Räumen allerdings nur bei milden Temperaturen möglich (DANTAS-TORRES et al., 2011a; DONGUS et al., 1996). Zecken wie *D. reticulatus* werden in Zentral- und Nordeuropa gefunden, während *I. ricinus* in ganz Europa mit Ausnahme der Mittelmeerregionen nachgewiesen werden kann und in manchen Regionen eine höhere Dichte zu entwickeln scheint (BEUGNET et al., 2009). Als Ursachen für die Ausbreitung der Zecken werden Vögel und andere Tierbewegungen, bei

Hunden vor allem Importe oder Reiseaktivitäten, aber auch Veränderungen der klimatischen Bedingungen diskutiert, die es den Zecken ermöglichen sich in bisher nicht endemischen Gebieten zu etablieren (BEUGNET et al., 2009; BEUGNET et al., 2011; HARTELT et al., 2007).

Hinzu kommt, dass Zecken gleichzeitig mit mehreren Pathogenen, auch des gleichen Genus, infiziert sein und diese übertragen können (BOWMAN et al., 2009; HILDEBRANDT et al., 2011a; KORDICK et al., 1999; RYMASZEWSKA et al., 2011). Der jeweils gegenseitige Einfluss der Erreger auf die Pathogenese, Entwicklung und Verlauf von Erkrankungen im Wirt ist allerdings häufig nicht bekannt.

Im Folgenden sind die Pathogene, eingeteilt nach deren Vektoren aufgeführt, die aufgrund ihres Krankheit auslösenden und zoonotischen Potenzials, aber auch aufgrund ihrer hohen Prävalenz in Zecken und damit erhöhten Wahrscheinlichkeit für simultane Übertragungen und Koinfektionen im Wirt in die Doktorarbeit einbezogen wurden (REYE et al., 2010; RYMASZEWSKA et al., 2011; SHAW et al., 2001).

### 1.1 Wichtige Pathogene mit *Ixodes ricinus* als Vektor

*Anaplasma phagocytophilum* (*Ap*), der Erreger der humanen granulozytären Anaplasiose des Menschen bzw. der kaninen granulozytären Anaplasiose des Hundes, ist ein zur Ordnung der Rickettsiales gehörendes, obligat intrazelluläres Bakterium, das sich hauptsächlich in neutrophilen Granulozyten vermehrt (CARRADE et al., 2009). Im Jahr 2001 wurden die Pathogene *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* und das Agens der humanen granulozytären Ehrlichiose unter dem Namen *Ap* zusammengefasst (DUMLER et al., 2001). Isolate von *Ap* weisen signifikante serologische Kreuzreaktivitäten, aber auch Variationen in den Nukleotidsequenzen der 16S rRNA (> 99,5 % Identität) und des *groESL*-Gens ( $\geq$  99,0 % Identität) auf (DUMLER et al., 2001).

Nach Carrade et al. können die Bakterien nach Infektion des Wirtes zwei unterschiedliche Formen ausbilden: schmale dichte Formen, die an die Wirtszellen binden, und retikuläre Formen, die sich intrazellulär vermehren und sich zu der erstgenannten Form umwandeln, bevor sie durch Ruptur der Wirtszelle freigesetzt werden. Nach der Zerstörung der Wirtszelle heften sich die Erreger an den P-Selektin-Glykoprotein-Liganden 1 (PSGL 1) und den Faktor Sialyl-Lewis X von neutrophilen Granulozyten an. Anschließend werden sie über Endozytose aufgenommen, womit gleichzeitig die Bildung des Phagolysosoms umgangen wird. Das intrazelluläre Überleben wird zudem durch die Hemmung der Superoxidproduktion und die Hemmung der Apoptose der Wirtszellen ermöglicht



(CARRADE et al., 2009). In infizierten neutrophilen Granulozyten wird außerdem die Bildung der PSGL-1 und L-Selektin-Liganden vermindert, wodurch die Zellen nicht mehr an das Endothel anheften können und deren Auswanderung in Zielgewebe und folglich die Immunabwehr gehemmt wird. Dieser Mechanismus der Immunsuppression erhöht das Risiko für sekundäre opportunistische Infektionen und hat bei Koinfektionen einen unterstützenden Einfluss auf die Etablierung der Erreger (CARRADE et al., 2009; THOMAS et al., 2001).

Die klinischen Veränderungen einer *Ap*-Infektion sind beim Hund vor allem Fieber und Lethargie, welche ein bis zwei Wochen nach der initialen Infektion auftreten können. Ebenso werden Anorexie, Bewegungsunlust und Lahmheiten beschrieben. Aufgrund der unspezifischen und in Europa häufig milden bis subklinischen und selbstlimitierend Verlaufsform können Infektionen bei Hunden übersehen werden (CARRADE et al., 2009). Neben dem intrazellulären Überleben der Bakterien wird die Umgehung des Immunsystems durch die Expression variabler Oberflächenproteinen, wie dem MSP2/P44, ermöglicht, wodurch hochspezifische Antikörper nicht mehr an die Erreger binden können (BROWN, 2008). Dies wirkt unterstützend auf die Entstehung persistenter Infektionen (BROWN, 2008), die bei Hunden, Pferden und Wiederkäuern trotz Therapie beschrieben wurden (BROWN, 2012; CARRADE et al., 2009; FRANZEN et al., 2009; SCORPIO et al., 2011). Es wird vermutet, dass sich die Bakterien in verschiedene Gewebe zurückziehen können, um den Kontakt mit Immunzellen und Antikörpern zu umgehen (CHANG et al., 1998). Zudem werden periphere Granulozyten als mögliches Reservoir diskutiert (FRANZEN et al., 2009). In persistent infizierten Lämmern konnten die Bakterien *post mortem* in Nieren, Knochenmark und Lymphknoten detektiert werden (STUEN et al., 2006). Durch Stress oder induzierte Immunsuppression, z. B. durch die Gabe von Dexamethason, konnten die Bakterien wieder mittels PCR und mikroskopischer Untersuchungen im Blut detektiert werden (EGENVALL et al., 2000; FRANZEN et al., 2009).

Borrelien sind schraubenförmig gewundene Bakterien der Familie Spirochaetaceae (Ordnung Spirochaetales) und werden in zwei Gruppen eingeteilt, die Gruppe der Rückfallfieber-Borrelien (wie z. B. *Borrelia recurrentis* und *Borrelia miyamotoi* sensu lato) und den *Borrelia-burgdorferi*-sensu-lato-Komplex. Dieser Komplex umfasst derzeit 18 Spezies, von denen aber nur ein Teil als Auslöser der LB gilt (MARGOS et al., 2011). Zu diesen zählen *Borrelia (B.) afzelii*, *B. garinii* und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

(*Bbss*). Studien der Nager-assoziierten Stämme des OspA Serotyps 4 von *B. garinii* ergaben, dass diese sich genetisch so deutlich von den an Vögel adaptierten Stämmen unterscheiden, dass sie als eigene Spezies anzusehen sind und als *Borrelia bavariensis* sp. nov. (*Bbav*) bezeichnet wurden (MARGOS et al., 2009). *B. afzelii* wurde beim Menschen häufig in kutanen Geweben nachgewiesen, bei *B. garinii* (*Borrelia bavariensis* sp. nov., *Bbav*) wurden neurologische Manifestationen und bei *Bbss* Arthritiden beobachtet (EIFFERT et al., 1998; MARGOS et al., 2011; VAN DAM et al., 1993). Ein reiner Gewebetropismus der verschiedenen Borrelienarten wurde allerdings nicht bewiesen, da auch eine Verbreitung in andere Organe gezeigt werden konnte (HOVIUS et al., 1999). Die übertragenden Zecken können mit mehr als einer Genospezies infiziert sein (RAUTER et al., 2002; RAUTER et al., 2005). Mehrfachinfektionen mit unterschiedlichen Genospezies wurden bei humanen LB-Fällen bereits beschrieben, allerdings ohne Aussage hinsichtlich der klinischen Symptomatik (DEMAERSCHALCK et al., 1995; RAUTER et al., 2005). Die Isolierung der Borrelienspezies *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. bissetti* und *B. spielmanii* aus menschlichen Geweben führte dazu, diese als weitere pathogene und LB-verursachende Spezies zu diskutieren (ESCUDERO et al., 2000; FINGERLE et al., 2008; MARGOS et al., 2011).

Bei Hunde gilt *Bbss* als erwiesen pathogene Spezies (APPEL et al., 1993). Für *B. afzelii* und *B. garinii* (*Bbav*) fehlen dagegen noch die Beweise für das Auftreten natürlicher Infektionen (KRUPKA et al., 2010). Die klinischen Veränderungen einer Infektion bei Hunden, die auch erst nach bis zu 5 Monaten auftreten können, umfassen vor allem durch Arthritiden bedingte Lahmheiten, welche nach der klinischen Genesung im Abstand von 2-4 Wochen an jeweils unterschiedlichen Extremitäten wiederkehren können, sowie leichtes Fieber (APPEL et al., 1993; BOWMAN et al., 2009). Da eine akute Infektion bei Hunden aufgrund der unspezifischen Symptome häufig nicht bemerkt und behandelt wird, können sich die Spirochäten in vom Immunsystem schwer erreichbare Nischen zurückziehen und chronische Erkrankungen verursachen (HOVIUS et al., 1999). Eine Beteiligung der Nieren mit Entwicklung von Glomerulonephritis in chronisch infizierten Hunden wurde beschrieben (LITTLE et al., 2010). Das Krankheitsbild der LB soll insbesondere durch die sekundären Reaktionen des Immunsystems auf die Erreger, unter anderem durch die Bildung kreuzreaktiver Antikörper, aber auch durch eine direkte durch T-Zellen vermittelte Immunantwort, entstehen (KNAUER et al., 2007; SEILER et al., 1996). Ein Anzeichen für die initial geschwächte Immunabwehr ist die geringe Anzahl neutrophiler Granulozyten, die im *Erythema migrans* beim Menschen gefunden wurden (HARTIALA et al., 2008).

Hierbei spielen vermutlich Oberflächenproteine der Borrelien wie OspB eine Rolle bei der Inhibition von Phagozytose und Komplementaktivierung oder wie OspA bei der oxidativen Zerstörung neutrophiler Granulozyten, aber auch lösliche Faktoren bei der Hemmung der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten (HARTIALA et al., 2008). Das Oberflächenprotein OspC, das während der Blutmahlzeit der Vektorzecke vermehrt exprimiert wird, wirkt sich ebenso begünstigend auf die Etablierung einer Infektion aus. Es verbindet sich mit dem Speichelprotein Salp 15 der übertragenden Zecke, welches die Aktivierung der T-Zellantwort im Wirt hemmt (EMBERS et al., 2008; RAMAMOORTHY et al., 2005).

Nach der Übertragung von der Zecke und Etablierung in der Haut des Wirtes, können sich die Borrelien über das Gewebe fortbewegen und in Gelenkkapseln, kollagenhaltiges Gewebe, Haut, Herz und zentrales und peripheres Nervensystem ausbreiten (HARTIALA et al., 2008; STRAUBINGER et al., 1997; STRAUBINGER et al., 2000a). Die Umgehung des Immunsystems geschieht zudem über die Variation von Oberflächenproteinen wie des VlsEs, welches vom auf dem linearen Plasmid lp28-1 liegenden *vlsE*-Lokus exprimiert wird (EMBERS et al., 2008; PALMER et al., 2009). Die zahlreichen Variationen der Proteinstruktur können von den gebildeten Antikörpern nicht erkannt werden, wodurch der Erreger nicht eliminiert werden kann (EMBERS et al., 2008). Zusätzlich zur Antigenvariation können sich die Spirochäten zu kugelförmigen Lebensformen umbilden, wenn sie ungünstige Bedingungen vorfinden (STRAUBINGER et al., 2000a). In diesen Formen können sie für mehrere Tage ohne metabolische Aktivität überleben und sich wieder in Spiralförmigen zurück wandeln, wenn die umgebenden Bedingungen günstiger sind. Unter diesen Bedingungen und der Tatsache, dass Borrelien in vom Immunsystem schwer erreichbaren Geweben persistieren, führt auch eine antibiotische Behandlung nicht zur völligen Eliminierung der Erreger (EMBERS et al., 2012; STRAUBINGER et al., 2000a).

Rickettsien sind obligat intrazelluläre Erreger und taxonomisch in die Ordnung der Rickettsiales eingegliedert. Aufgrund ihrer Pathogenität und phänotypischer Eigenschaften wurden einzelne Spezies in den Gruppen der epidemischen Typhus Group (TG) Rickettsien (z. B. *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia typhi*) und der Spotted Fever Group (SFG) Rickettsien zusammengefasst (FOURNIER et al., 2009). SFG-Rickettsien werden hauptsächlich von Zecken übertragen, mit Ausnahme von *Rickettsia felis* und *Rickettsia akari*, welche Flöhe und Milben als Vektoren nutzen (FOURNIER et al., 2009). Von Zecken übertragene Rickettsiosen gehören zu den Zoonosen, die am längsten als von

Vektoren übertragene Erkrankungen bekannt sind (PAROLA et al., 2005a). Parola et al. beschrieb für SFG-Rickettsien, dass Zecken, die mit einer dieser Spezies infiziert sind, unempfindlich für andere Rickettsienspezies sind. Die verschiedenen Erreger scheinen sich innerhalb der Zecke zu hemmen, so dass sich nur eine Spezies im Vektor etablieren kann, was wiederum Auswirkungen auf die Verbreitung der verschiedenen Rickettsienarten hat (PAROLA et al., 2005a). Die Pathogenität der Erreger hängt von der jeweiligen Rickettsienspezies ab. Nach der Übertragung von der Zecke auf den Wirt replizieren die Pathogene in den endothelialen Zellen von Blutgefäßen. Die entstehende Vaskulitis löst die klinische Symptomatik und hämatologischen Veränderungen aus (RAOULT et al., 1997). Die SFG-Rickettsien können durch die Ausbildung von Aktinfilamenten innerhalb der Wirtszelle und von Zelle zu Zelle wandern (GOUIN et al., 2004; RAOULT et al., 1997).

Für *Rickettsia helvetica* (*Rh*), einer Spezies der SFG-Rickettsien, wurde sowohl die transstadiale als auch die transovarische Übertragung in *I. ricinus* nachgewiesen (BORETTI et al., 2009). Die Zeckenspezies gilt daher nicht nur als Vektor, sondern auch als Erregerreservoir (PAROLA et al., 2005a). Infektionen mit *Rh* können beim Menschen grippeähnliche Symptome auslösen, die in der Regel selbstlimitierend verlaufen (NILSSON, 2009). Es wurden allerdings auch schwere Verlaufsformen mit Muskelschmerzen und Hautausschlag an den Extremitäten beschrieben (FOURNIER et al., 2004; NILSSON, 2009). Für Hunde ist nicht bekannt, ob eine Infektion mit *Rh* klinische Veränderungen hervorrufen kann. Eine Beziehung von Fieber unbekannter Herkunft (fever of unknown origin, FUO) mit einer zugrunde liegenden Infektion mit *Rh* wird für Hunde allerdings diskutiert (BORETTI et al., 2009). Zudem werden größere Säugetiere als Reservoirwirte für *Rh* vermutet, da von diesen Tieren gesammelte Zecken hohe Prävalenzraten aufwiesen und in Hirschen der Nachweis der *Rh*-DNA gelang (BORETTI et al., 2009; INOKUMA et al., 2008). Im Zusammenhang mit den hohen Prävalenzraten in *I. ricinus*, welche in der Vegetation gesammelt wurden (BORETTI et al., 2009; SEVERINSSON et al., 2010), sollte die Pathogenität dieser Rickettsienspezies, insbesondere hinsichtlich ihres Einflusses auf die Pathogenese bei Koinfektionen, weiter abgeklärt werden. Als weiterer Vektor für *Rh* dient möglicherweise auch *D. reticulatus* (DOBEC et al., 2009).

## 1.2 Wichtige Pathogene mit *Dermacentor reticulatus* als Vektor

Babesien gehören zum Stamm der Apikomplexa (Eukaryota) und werden nach ihrer Morphologie in große (3,0-5,0 µm) und kleine (1,5-2,5 µm) Babesien eingeteilt (CACCIO et al., 2002). *Babesia (B.) canis* und *B. vogeli* (Vektor *R. sanguineus*), die aufgrund ihrer Unterschiede hinsichtlich Klinik, Vektor und genetischer Eigenschaften als separate Spezies angesehen werden (SOLANO-GALLEGO et al., 2011), werden den großen, *B. gibsoni* den kleinen Babesien zugeordnet.

Im Darm der Zecke formen sich die über das Blut aufgenommenen Piroplasma zu Gameten um, die sich wiederum zu motilen Zygoten umbilden. Diese vermehren sich und wandern in verschiedene Gewebe der Zecke, einschließlich der Ovarien, aus, wodurch die transovarielle Übertragung zustande kommt. In die Speicheldrüsen der Zecken ausgewanderte Zygoten reifen nach Anheften der Zecke an einen Wirt zu Sporozoiten (UILENBERG, 2006). Die Erreger infizieren nach Übertragung auf den Wirt die Erythrozyten und vermehren sich dort. Je nach Erregerspezies, Alter des Tieres, Immunstatus und gleichzeitig bestehender Infektion oder Erkrankung verläuft die Babesiose unterschiedlich schwer (IRWIN, 2009). Das Leitsymptom, welches von Solano-Gallego et al. beschrieben wurde, ist Anämie. Diese ist multifaktoriell bedingt und induziert selbst eine Reihe von Immunantworten, welche den Verlauf der Erkrankung stark beeinflussen können. Zu diesen Reaktionen des Immunsystems, die zusätzlich zur Zerstörung von Erythrozyten führen, gehören unter anderem die Bindung von Antikörpern auf die Zelloberfläche, Komplementaktivierung, die Bildung hämolytischer Faktoren im Serum und die oxidative Schädigung von Erythrozyten (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

*B. canis* kann bei Infektion von Hunden akute Erkrankungen mit Fieber, Apathie, Hämolyse, Anämie und Thrombozytopenie auslösen (SOLANO-GALLEGO et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Zusätzlich werden atypische klinische Veränderungen mit zerebraler, gastrointestinaler und okulärer Beteiligung beschrieben, welche die Diagnosestellung erschweren (BOURDOISEAU, 2006). Eine Parasitämie ist nur bei 1-2 % der Fälle zu beobachten und korreliert nicht notwendigerweise mit der Schwere der klinischen Veränderungen (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Auch nach Ansprechen auf eine antibiotische Therapie mit Normalisierung der Leber- und Nierenfunktionen und der Blutparameter, konnte im Blut klinisch gesunder Hunde Erreger-DNA nachgewiesen werden (WELC-FALECIAK et al., 2009). Bei diesen chronisch subklinisch infizierten Hunden besteht neben dem Risiko eines Ausbruchs der Babesiose z. B. durch

Immunsuppression bei Stress oder andere (infektiöse) Erkrankungen, auch das Risiko einer sekundären Beteiligung von Organen wie Nieren und Leber (WELC-FALECIAK et al., 2009). Daher ist eine frühzeitige Therapie mit Überprüfung des Therapieerfolgs notwendig (WELC-FALECIAK et al., 2009), da die beschriebene chronisch persistente Parasitämie auch ein Risiko für die weitere Verbreitung des Erregers, insbesondere über importierte oder auf Reisen mitgenommene Hunde, darstellt (HAMEL et al., 2011; OTRANTO et al., 2010). In Europa wurde bisher ein Fall einer humanen Babesiose mit *Babesia canis* sp. dokumentiert (KJEMTRUP et al., 2000).

### 1.3 Wichtige Pathogene mit *Rhipicephalus sanguineus* als Vektor

*Anaplasma platys* (*Apl*) ist ein obligat intrazelluläres Bakterium, das Thrombozyten infiziert (GAUNT et al., 2010). Das Bakterium ist ein Mitglied der Familie der Anaplasmataceae (Ordnung Rickettsiales) und löst bei Hunden die zyklische Thrombozytopenie aus. Es wurde angenommen, dass der Erreger durch *R. sanguineus* übertragen wird, was allerdings noch nicht sicher nachgewiesen werden konnte (GAUNT et al., 2010; SIMPSON et al., 1991). In neueren Studien wird dagegen *Rhipicephalus turanicus* als potentieller Vektor angegeben (HARRUS et al., 2011a). Eine Übertragung der Bakterien auf den Menschen konnte bisher nicht nachgewiesen werden (GAUNT et al., 2010).

Eine Infektion mit dem Pathogen kann in Hunden subklinische bis schwere Verlaufsformen auslösen. Abhängig vom jeweiligen Erregerstamm, dem Immunstatus des Tieres, zusätzlichen Stressfaktoren und der Rasse, treten unterschiedliche Schweregrade von Fieber, Lethargie und Blutungen mit Petechien und Ekchymosen auf (AGUIRRE et al., 2006; DE LA FUENTE et al., 2006; GAUNT et al., 2010). Die Zerstörung der Thrombozyten soll einerseits als direkte Konsequenz der Infektion durch sich replizierende Erreger, andererseits durch immunmedierte Mechanismen besonders in den folgenden Phasen der Parasitämien zustande kommen (HARVEY et al., 1978). Koinfektionen mit anderen von *R. sanguineus* übertragenen Erregern wie z. B. *Ehrlichia canis* (*Ec*) oder *B. vogeli* können den Erkrankungsverlauf und die klinischen Veränderungen zusätzlich verschlimmern (DE CAPRARIIS et al., 2011; EDDLESTONE et al., 2007b; GAUNT et al., 2010). Bei gleichzeitiger Infektion mit *Ec* und *Apl* wurden in experimentellen Studien eine stärkere Ausprägung der Anämie und Thrombozytopenie festgestellt, als bei Infektionen mit den einzelnen Erregern (GAUNT et al., 2010). Zudem war der Verlauf der *Apl*-Infektion persistenter als bei einer Einzelinfektion.

*Ehrlichia canis* (*Ec*) ist der Erreger der kaninen monozytäre Ehrlichiose und wird der Familie der Anaplasmataceae (Ordnung Rickettsiales) zugeordnet. Die Bakterien vermehren sich obligat intrazellulär, infizieren bei Hunden mononukleäre Zellen wie Monozyten und Makrophagen und lösen Erkrankungen mit subklinischen bis hin zu schweren Verlaufsformen aus (HARRUS et al., 2011b; SHAW et al., 2001). Dabei können klinische Veränderungen wie Lethargie, Anorexie, Fieber und Gerinnungsstörungen ebenso wie okuläre oder zentrale Manifestationen beobachtet werden (HARRUS et al., 2011b). Die Sequestrierung von Thrombozyten in der Milz oder Zerstörung durch immunmedierte Mechanismen sollen zu einer Thrombozytopenie führen, welche als Ursache der beschriebenen Gerinnungsstörungen gilt (GAUNT et al., 2010; HARRUS et al., 2011b; SHAW et al., 2001). Infektionen von Menschen mit *Ec* wurden dokumentiert (DAY, 2011).

Während der asymptomatischen Verlaufsform, die sich nach der akuten Phase entwickeln und über Jahre hinziehen kann, wurde der Erreger bei Hunden vor allem in der Milz nachgewiesen (HARRUS et al., 1998). Zudem scheint auch das Knochenmark ein präferierter Rückzugsort bei chronischen Infektionen mit *Ec* zu sein (MYLONAKIS et al., 2004). Andere Manifestationsorte sind Leber, Nieren und Lymphknoten, aber auch im peripheren Blut konnten die Erreger detektiert werden (GAL et al., 2008; HARRUS et al., 1998). In der chronischen Phase treten Veränderungen im Blutbild, wie Thrombo- und Panzytopenie, aber auch Knochenmarkshypoplasie auf, die durch zusätzliche Erkrankungen oder schwere Blutungen zum Tod des Tieres führen können (MYLONAKIS et al., 2004).

Eine Infektion mit *Babesia vogeli* verursacht in Hunden milde klinische bis subklinische Veränderungen und wird häufig im Zusammenhang mit zusätzlichen Erkrankungen detektiert (CACCIO et al., 2002; SOLANO-GALLEGO et al., 2008). Die klinischen Veränderungen scheinen kein homogenes klinisches Muster aufzuweisen und hängen vom Alter des Tieres, bereits durchgeführten Eingriffen, insbesondere einer Splenektomie, und anderen prädisponierenden Faktoren, wie gleichzeitig bestehenden Infektionskrankheiten oder Immunsuppression, ab (SOLANO-GALLEGO et al., 2008). Hunde mit subklinisch akuter oder chronischer Infektion mit *B. vogeli* können eine schwere Erkrankung entwickeln, wenn zusätzliche Infektionen, wie mit Leishmaniose oder anderen durch die gleiche Zecke übertragenen Erregern z. B. *Ec* oder *Apl* auftreten (CARDOSO et al., 2010a; CARDOSO et al., 2010b; GAL et al., 2007). Ebenso können Organerkrankungen wie

chronische Niereninsuffizienzen den Verlauf verschlechtert. Akute schwere Erkrankungen mit Fieber, Lethargie, hämolytischer Anämie, Anorexie und Ikterus wurden insbesondere bei jungen Hunden und Welpen beschrieben (SOLANO-GALLEGO et al., 2008).

Infektionen mit *Babesia gibsoni* können bei Hunden schwere Erkrankungen mit hämolytischer Anämie, Multiorganversagen und Tod, aber auch milde bis inapparent chronische klinische Veränderungen verursachen (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; TROTTA et al., 2009). Der Erreger wurde in Europa im Blut von Hunden aus Spanien, Italien und Deutschland nachgewiesen (CRIADO-FORNELIO et al., 2003; HARTELT et al., 2007; TROTTA et al., 2009). Babesiose-Fälle aus den USA und Australien lassen eine erhöhte Anfälligkeit von American Pit Bull Terriern und American Staffordshire Terriern vermuten (BIRKENHEUER et al., 2005; JEFFERIES et al., 2007). Neben rassebedingter Anfälligkeiten werden als Ursachen dafür auch Bissverletzungen z. B. aus Hundekämpfen diskutiert, bei denen die Erreger durch infiziertes Blut übertragen werden (BIRKENHEUER et al., 2005). Bluttransfusionen stellen ein weiteres Risiko für *B.-gibsoni*-Infektionen dar, ebenso wie die transplazentare Übertragung (FUKUMOTO et al., 2005; STEGEMAN et al., 2003). Trotz antibiotischer Therapie kann eine Infektion in einem chronischen, phasenweise asymptomatischen Verlauf resultieren, der zu immunmedierten Komplikationen wie Glomerulonephritis und Polyarthritiden führen kann (STEGEMAN et al., 2003). Auch nach erfolgreicher Therapie mit Besserung der klinischen Veränderungen konnte zeitweise Erreger-DNA im Blut nachgewiesen werden. Die lässt auf eine fluktuierende Parasitämie in den Hunden schließen (IRWIN, 2009). Der zeitweise mögliche Nachweis im Blut ist auch bei humanen Babesiose-Fällen mit anderen Erregerspezies, wie *Babesia microti*, beschrieben.

*Rickettsia conorii* (*Rc*) gehört zu den SFG-Rickettsien und kann wie *Rh* in der Zecke sowohl transstadial als auch transovariell übertragen werden (SOCOLOVSKI et al., 2009). Der Erreger verursacht beim Menschen das Mittelmeerfleckfieber (Mediterranean spotted fever) (SOLANO-GALLEGO et al., 2006). Die Erkrankung ist in der Mittelmeerregion bzw. Südeuropa und Nordafrika endemisch (PAROLA et al., 2005a). Beim Menschen verursachen Infektionen mit *Rc* eine akute fieberhafte Erkrankung mit Hautausschlag, der sich von der Stelle des Zeckenbisses bis über die Extremitäten ausbreiten kann (PAROLA et al., 2005a). In etwa 6 % der Fälle verläuft die Erkrankung mit schwerwiegenden Symptomen mit neurologischer Manifestation und Organbeteiligung



(AMARO et al., 2003; RAOULT et al., 1983). Zu den Risikofaktoren, die zur Entwicklung der schweren Form beitragen, zählen Immunsuppression und ein später Beginn der Behandlung (PAROLA et al., 2005b).

Serologische Studien über *Rc* zeigten hohe Prävalenzraten von bis zu 60 % in Hunden aus endemischen Gebieten (HARRUS et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2006). Es wurde angenommen, dass Hunde zumindest zeitweilig als Reservoir der Bakterien dienen können (HARRUS et al., 2007; LEVIN et al., 2011). Eine Korrelation zwischen der Erkrankung von Menschen und dem Nachweis von Antikörpern bei Hunden wurde diskutiert (HARRUS et al., 2007; MUMCUOGLU et al., 1993) und die Exposition von Menschen zu seropositiven Hunden als Risikofaktor einer Infektion vermutet (SOLANO-GALLEGO et al., 2006). Die Übertragung der Erreger von infizierten Hunden auf die Vektorzecke konnte experimentell nachgewiesen werden (LEVIN et al., 2011). Damit scheinen Hunde vor allem eine Rolle für den Eintrag der Überträgerzecke und des Erregers in nicht endemische Gebiete zu spielen und damit das Risiko einer Infektion des Menschen zu erhöhen (LEVIN et al., 2011; SENNEVILLE et al., 1991).

Die klinischen Veränderungen bei Hunden mit *Rc*-Infektion hingen bei experimentellen Versuchen vom verwendeten Stamm, aber auch von der Injektionsmethode (Zeckenbiss, Nadelinokulation) ab (LEVIN et al., 2011). Die Klinik umfasste bei experimentell und natürlich infizierten Hunden mildes Fieber, Anorexie und Lethargie (LEVIN et al., 2011; SOLANO-GALLEGO et al., 2006). Im Allgemeinen verläuft die klinische Erkrankung beim Hund aber so mild, dass eine Diagnostik von *Rc* in Hunden eher als Risikoeinstufung für den Menschen angesehen wird (HARRUS et al., 2007; LEVIN et al., 2011).

## **2 Koinfektionen und Persistenz**

Häufig sind Zecken gleichzeitig mit mehreren Erregern infiziert (BELONGIA, 2002; HILDEBRANDT et al., 2011a; REYE et al., 2010). Infektionen mit multiplen Erregern im Wirt können einerseits durch simultane Übertragung der Erreger, aber auch durch eine unabhängige Übertragung durch verschiedene Zecken und zu verschiedenen Zeitpunkten entstehen (CARDOSO et al., 2010b; GAUNT et al., 2010; KORDICK et al., 1999). Damit steigt das Risiko von Mehrfachinfektionen bei einer Exposition zu mehreren Zecken an. Häufig sind die Folgen einer solchen simultanen oder auch sequentiellen Infektion mit verschiedenen Pathogenen für den Verlauf der Infektion bzw. der Erkrankung noch nicht genauer bekannt. Vorhandene Studien fokussieren vor allem auf Koinfektionen mit *Ap* und

*Borrelia* spp., da diese Bakterien als zunehmend wichtige Infektionserreger angesehen werden (CHOMEL, 2011; NICHOLSON et al., 2010).

In einer eigenen, dieser Arbeit vorangestellten Studie wurde die Thematik der Koinfektion von Hunden mit *Borrelia* spp. und *Ap* aufgegriffen. Dabei wurden Untersuchungen auf Infektionen mit den beiden Erregern bei Hunden durchgeführt und die Ergebnisse in Bezug zum Vorbericht und zum klinischen Status der Tiere ausgewertet. Im Rahmen von Routineuntersuchungen in den Kleintierkliniken, Abteilungen Innere Medizin und Chirurgie, der Veterinärmedizinischen Universitäten von Berlin, Gießen, Leipzig, Hannover und München wurden dabei Hunde mit dem 4Dx SNAP<sup>®</sup> Test (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA) serologisch auf Antikörper gegen *Ap* und *Borrelia* spp. untersucht. In jeder Klinik wurden SNAP Test-positive und –negative Blut- und Serumproben gesammelt. Insgesamt wurden 627 dieser vorselektierten Proben im Rahmen der Studie weiter bearbeitet. Alle Serumproben wurden mittels des Zweistufentests (ELISA und Western Blot) auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen *Borrelia* spp. getestet. Außerdem wurden alle 627 Blutproben auf *Ap*-spezifische DNA mittels einer *msp2* real-time PCR (COURTNEY et al., 2004) untersucht und positive Ergebnisse durch Klonierung und Sequenzierung des *groESL*-Gens (CHAE et al., 2000) zusätzlich bestätigt.

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen deckten sich mit früheren Studien aus Deutschland. Auch hier reagierte der Großteil der vorselektierten Proben positiv auf *Ap*-Antikörper und ein geringerer Teil auf *Borrelia*-spp.-Antikörper (KRUPKA et al., 2007). Der Vergleich der PCR-Ergebnisse mit der serologischen Diagnostik von *Ap* ließ Rückschlüsse auf die jeweilige Phase der Infektion zu. Zum Beispiel wurde angenommen, dass Hunde, die in beiden Tests für *Ap* positiv waren, zum Zeitpunkt einer akuten Infektion beprobt wurden. Für diese Tiere waren vermehrt Thrombozytopenien und Fieber im Vorbericht angegeben. Tiere, die nur positiv für den Nachweis *Ap*-spezifischer DNA waren, wurden dagegen in eine frühere Infektionsphase eingestuft (noch keine Antikörperbildung) und zeigten keine klinischen Auffälligkeiten. Diese Ergebnisse korrelierten mit den Beschreibungen möglicher klinischer Veränderungen bei akuten und subklinischen *Ap*-Infektion (CARRADE et al., 2009; KOHN et al., 2010; PUSTERLA et al., 1997; RAVNIK et al., 2011). Hunde, in denen gleichzeitig Antikörper gegen *Ap* und *Borrelia* spp. nachgewiesen werden konnten, zeigten im Vergleich zu Hunden mit Antikörpern gegen nur einen der beiden Erreger oder ohne spezifische Antikörper keine

signifikanten klinischen Auffälligkeiten. Bei diesen Ergebnissen sind allerdings insbesondere die geringe Anzahl an positiven Proben ( $n = 33$ ), der Nutzen der Serologie für akute *Ap*-Infektionen, sowie die Erstellung eines umfassenden Vorberichts mit klinischen Veränderungen zu diskutieren und der Einfluss auf die Ergebnisse abzuwägen. Die Ergebnisse zeigten, dass Infektionen mit einzelnen oder beiden Erregern häufig vorkommen und dass der Einfluss auf die klinischen Veränderungen weiter untersucht werden muss.

Auch in der Humanmedizin wurde bisher ein Schwerpunkt auf die Diagnostik von *Borrelia* spp. und *Ap* Koinfektionen gelegt, da *Borrelia* spp. in Zecken hohe Prävalenzraten aufweist (NIETO et al., 2009; RICHTER et al., 2012) und daher ein hohes Infektionsrisiko darstellt. In den USA zeigen detektierte *Ap*-Stämme im Vergleich zu europäischen Stämmen zudem eine höhere Virulenz mit höherer Mortalitätsrate (ALBERTI et al., 2005). Die Immunpathogenese von *Ap*-Infektionen lässt außerdem auf einen synergistischen Einfluss hinsichtlich der Etablierung und Pathogenese weiterer Erreger schließen. *Ap* infiziert hauptsächlich neutrophile Granulozyten und hindert diese daran, unter anderem durch eine geringere Expression der P-Selektin-Glykoprotein-Liganden 1 und des L-Selektins, an endotheliale Zellen zu adhären und durch die endotheliale Barriere zu migrieren (CHOI et al., 2003; DUMLER et al., 2005). Zusätzlich scheinen die Bakterien über Eingriffe in die Genexpression der Wirtszelle mit Effektorproteinen wie dem Anka die Funktion der neutrophilen Granulozyten zu modifizieren (DUMLER et al., 2005; GARCIA-GARCIA et al., 2009). Die entstehende Immunsuppression begünstigt gleichzeitig vorhandene Infektionen (BEALL et al., 2008; CHOI et al., 2003; DUMLER et al., 2005). In experimentellen Studien konnte bei Koinfektionen mit den Erregern *Ap* und *Borrelia* spp. zudem eine synergistische Hemmung des Immunsystems beobachtet werden (THOMAS et al., 2001; ZEIDNER et al., 2000). Die Experimente ergaben eine geringere Produktion Th1 assoziierter Zytokine (u.a. IL-2, IFN $\gamma$ ) (ZEIDNER et al., 2000). Insbesondere die verminderte IFN $\gamma$ -Produktion wirkte unterstützend auf das initiale Überleben intrazellulärer Bakterien und wurde auch bei der Koinfektion mit *Ap* und *Bb* beobachtet (ZEIDNER et al., 2000). Durch die Steigerung der durch Th2-Zellen regulierten Immunantwort wurde vermehrt IL-4 produziert, das wiederum die IL-2 vermittelte Differenzierung der CD4<sup>+</sup> Zellen und die Bildung von IFN $\gamma$  inhibierte (ZEIDNER et al., 2000).

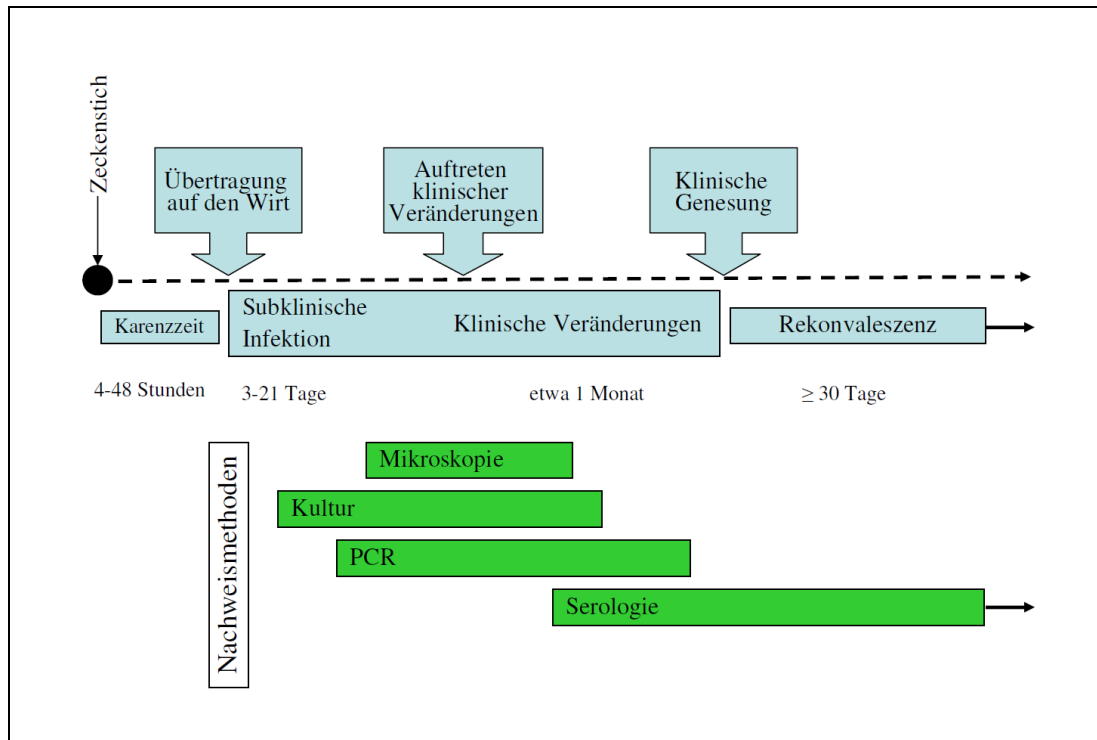
Die Etablierung mehrerer Infektionen wirkt sich auch auf die entstehende Symptomatik und Therapiemöglichkeiten aus. Beispielsweise wurden bei Koinfektionen von Menschen mit Erregern der LB und *Ap* persistente und atypische klinische Symptome beobachtet (KRAUSE et al., 2002). Im Gegensatz zu Einzelinfektionen wurden bei Koinfektionen mit *Babesia* spp. und Erregern der LB schwerere und länger dauernde Verläufe beschrieben (KRAUSE et al., 1996). Im Weiteren zeigten Studien über Koinfektionen von *Babesia* spp. mit *Ec* bzw. von *Ec* mit *Apl* eine Veränderung des klinischen Bildes und Verstärkung der Symptomatik (GAUNT et al., 2010; KORDICK et al., 1999).

Häufig ist der Einfluss einer zusätzlichen Infektion bei bestehender persistenter Infektion nicht genauer bekannt. Insbesondere bei Erregern, die aufgrund von milden und subklinischen Symptomatiken nicht therapiert werden und in chronisch persistierenden Erkrankungen resultieren, können im Zusammenhang mit einer akuten Infektion eines zusätzlichen Erregers schwere Erkrankungsverläufe durch die wieder aktivierte, eigentlich latente Infektion auftreten (CARDOSO et al., 2010a; GAL et al., 2007). In der Humanmedizin wurde dabei vor allem der Einfluss einer Infektion mit *Anaplasma* spp. bzw. *Ehrlichia* spp. auf Erkrankungen des Immunsystems, wie Leukämie und *Lupus erythematoses*, untersucht (KALLICK, 2011).

Neben dem gegenseitigen Einfluss verschiedener Erreger auf chronische Infektionen, müssen persistent infizierten Tiere mit Parasitämiephasen zudem als Infektionsreservoir angesehen werden (SCORPIO et al., 2011). Dies spielt bei der Ausbreitung der Erreger und dem Eintrag von Pathogenen in nicht endemische Gebiete eine Rolle (HAMEL et al., 2011; OTRANTO et al., 2010).

### **3 Bisherige diagnostische Möglichkeiten**

Die Auswahl der Diagnostikmethode ist durch die Pathogenese des jeweiligen Erregers, den Erkrankungsverlauf und den Zeitpunkt der Diagnostik bestimmt (Abbildung 2). In den folgenden Kapiteln wird eine Übersicht über die gängigen Nachweismethoden in der Routinediagnostik gegeben.



**Abbildung 2: Allgemeines Diagnostikschema für rickettsiale Erreger**

modifiziert nach Nicholson et al. und Egenvall et al. (EGENVALL et al., 1998; NICHOLSON et al., 2010)

### 3.1 Serologie

Ein wichtiger Teil der Diagnostik der durch Zecken übertragenen Erreger ist die Serologie. Diese ist allerdings für die Diagnose einer akuten Infektion nicht geeignet, ebenso wie die Aussage eines positiven Testergebnisses in endemischen Gebieten limitiert ist (IRWIN, 2009; SHAW et al., 2001).

Der positive Antikörper-Nachweis stellt, insbesondere bei LB, im Zusammenhang mit dem Vorhandensein klinischer Veränderungen und dem Vorbericht der Zeckenexposition einen wichtigen Hinweis für die Diagnose dar. Für die LB-Diagnostik gilt momentan ein ELISA, z. B. basierend auf Borrelien-Ganzzellysat oder rekombinanten Proteingemischen, mit genauere Spezifizierung mittels Western Blot bzw. Line-Immuno-Assay als Methode der Wahl (KRUPKA et al., 2010). Dieser Zweistufentest weist einerseits eine hohe Sensitivität, durch die Verwendung von Ganzzellysat der Borrelien auf, andererseits wird eine Unterscheidung von Infektion und Impfung ermöglicht.

Kommerziell werden auch serologische Schnelltests wie der 4Dx SNAP<sup>®</sup> Test angeboten. Dieser detektiert unter anderem Antikörper gegen *Borrelia* spp., *Ap* und *Ec*. Bei der Detektion von *Ap* können allerdings Kreuzreaktionen mit *Apl* auftreten, die auf Grundlage

des (epidemiologischen) Vorberichts und weiterer Diagnostik ausgeschlossen werden müssen (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA). Für *Ap*, *Ec* und *Apl*, wird in der Routinediagnostik der indirekte Immunfluoreszenztest (IFA, immunofluorescence assay) verwendet, der jedoch durch Kreuzreaktionen mit jeweils anderen Spezies der Genera *Ehrlichia* oder *Anaplasma* falschpositive Ergebnisse liefern kann (GREENE, 2012; M'GHIRBI et al., 2009). Bei akuten Infektionen wird ein vierfacher Titeranstieg für eine Diagnosestellung vorausgesetzt, da Antikörper auch noch Jahre nach einer akuten Infektion nachweisbar sein können (CARRADE et al., 2009; HARRUS et al., 2011b).

Zum Nachweis einer, eventuell auch latenten *Babesia* spp. Infektion wird in der Regel der IFA eingesetzt (GREENE, 2012). Dabei muss vor allem das Auftreten von Kreuzreaktionen mit anderen Spezies aber auch anderen Apikomplexa berücksichtigt werden (IRWIN, 2009). Die Unterscheidung zwischen akuter und chronischer Infektion ist bei der Diagnostik der Babesien genauso problematisch wie ein positiver Antikörpertiter in endemischen Gebieten. In diesen Fällen sollte die Serologie im Zusammenhang mit einer PCR interpretiert werden (IRWIN, 2009).

Nach dem früher angewandten Proteus OX-19 Agglutinationstest (Weil-Felix-Reaktion), der neben einer geringen Sensitivität auch viele Kreuzreaktionen aufweist, wurde der IFA für die Rickettsiendiagnostik entwickelt. Dieser ermöglicht allerdings keine Differenzierung einzelner Rickettsienspezies und ist für die Entscheidung eines frühen Therapiebeginns nicht geeignet (WÖLFEL et al., 2008).

### 3.2 Mikroskopie

Bei Verdacht auf eine Infektion mit *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. oder *Babesia* spp. kann die Mikroskopie einen ersten Hinweis liefern. Negative Befunde sollten allerdings weiter verifiziert werden, da die mikroskopische Untersuchung in der Regel nur eine geringe Sensitivität aufweist. Beispielsweise konnten bei einer Infektion mit *Ap* nur in 3-34 % der neutrophilen Granulozyten spezifische Einschlüsse gefunden werden (EGENVALL et al., 1998; POITOUT et al., 2005). Diese Einschlüsse waren in experimentellen Studien nur für 4 bis 8 Tage mikroskopierbar (CHANG et al., 1998; EGENVALL et al., 1998). Bei *Babesia* spp. traten Parasitämien sogar nur in 1-2 % der Fälle auf und waren oft intermittierend, so dass eine Diagnosestellung insbesondere bei chronischen Infektionen erschwert ist (IRWIN, 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). *Apl* Einschlüsse in Thrombozyten können ebenso nur zyklisch beobachtet werden bzw. reduziert sich in folgenden Parasitämien die Anzahl zirkulierender Bakterien

(EDDLESTONE et al., 2007b; HARVEY et al., 1978). Zudem ist eine Differenzierung verschiedener Erregerspezies anhand der Mikroskopie alleine nicht möglich, wie z. B. die Unterscheidung von *B. gibsoni* von *B. microti* (CACCIO et al., 2002; TABAR et al., 2009) bzw. *Ap* von *Ehrlichia ewingii* (GREENE, 2012).

### 3.3 Kultur

Bei durch Zecken übertragenen Erregern ist die Kultur, insbesondere bei akuten, schweren Krankheitsverläufen, aufgrund langer Kultivierungsdauer nicht für die Routinediagnostik geeignet. *Borrelia* spp. haben beispielsweise Generationszeiten von 8-24 h (BARBOUR, 1988) und die Kultur von *Rickettsia* spp. kann bis zu 1-2 Wochen (WÖLFEL et al., 2008), von *Ec* bis 1-4 Wochen dauern (MCBRIDE et al., 1996). Trotz der hohen Spezifität kann, insbesondere für *Borrelia* spp., die Sensitivität zu gering sein, wenn im Untersuchungsmaterial nur wenige Erreger vorhanden sind. Zudem besteht die Gefahr von Kontaminationen des Mediums (KRUPKA et al., 2010). Die Kultur findet daher eher in der Forschung Anwendung.

### 3.4 Konventionelle und real-time-quantitative PCR

Abhängig von der Erregerspezies ist eine frühe und sensitive Diagnostik zur Festlegung einer initialen Therapie in der akuten Erkrankungsphase nötig, z. B. bei Infektionen mit *Rickettsia* spp. (PAROLA et al., 2005a) oder *Ec* (MCBRIDE et al., 1996). Die PCR bietet die Möglichkeit die Pathogene hochspezifisch und –sensitiv zu detektieren. Dabei ist es von Vorteil bei der Entwicklung der PCR möglichst zu amplifizierende Gene auszuwählen, die mehrfach im Genom des Erregers vorkommen (multi copy Gene) wie beispielsweise das *p30*-Gen von *Ec* oder das *msp2*-Gen von *Ap*, da damit eine hohe Nachweissensitivität gewährleistet wird (COURTNEY et al., 2004; HARRUS et al., 2011b). Aufgrund einer geringen Erregerlast im Untersuchungsmaterial kann die PCR allerdings auch eine zu niedrige Sensitivität aufweisen um eine sichere Diagnostik zu ermöglichen. Insbesondere bei chronischen Infektionen bei denen sich Erreger wie *Ap*, *Borrelia* spp. oder *Babesia* spp., nach Parasitämiephasen in Organe oder durch das Immunsystem schwer erreichbare Nischen zurückziehen, kann der Nachweis erschwert sein (IRWIN, 2009). Neben der eigentlichen Detektion eignet sich die PCR auch zur weiteren Speziesdifferenzierung durch den Nachweis speziesspezifischer Gene oder Sequenzierung des erhaltenen PCR-Produkts.

Gegenüber der konventionellen PCR bietet die real-time PCR die Vorteile einer höheren Sensitivität, Spezifität und eines schnelleren Nachweises (HARRUS et al., 2011b; PAHL et al., 1999). Setzt man das Ergebnis der PCR mit Standardkurven/-verdünnungen ins Verhältnis, kann eine Quantifizierung der Pathogene in der Probe vorgenommen werden. Diese Quantifizierung wird beispielsweise in Studien zur Überprüfung der Immunantwort, der Effizienz einer Impfung oder einer Therapie eingesetzt (IRWIN, 2009).

Sowohl mit konventioneller, als auch mit real-time PCR können durch die Verwendung mehrerer Primerpaare in einer Reaktion diverse Erreger gleichzeitig, mit Kosten- und Zeitersparnis, nachgewiesen werden (COURTNEY et al., 2004; PELEG et al., 2010). Die beschriebenen Multiplex-PCRs, für den Nachweis mehrerer durch Zecken übertragener Pathogene, waren allerdings mehrstufig aufgebaut. Zum Beispiel wurden verschiedene Genera in einem ersten Schritt detektiert, und danach durch einzelne PCRs die weitere Differenzierung der Spezies vorgenommen (TOKARZ et al., 2009). In einer anderen Studie mussten, aufgrund der begrenzten Anzahl zu detektierender TaqMan-Sonden im PCR-Cycler, die verschiedenen Genera auf zwei Analysen aufgeteilt werden (SIRIGIREDDY et al., 2005).

### **3.5 Next Generation Sequencing (NGS)**

In den letzten Jahren wurden neue Nachweismethoden, basierend auf der Sequenzierung entwickelt, die einen massiven parallelen Ansatz von DNA-Sequenzierungen ermöglichen (NGS). Oft beruhen diese auf dem „sequencing-by-synthesis“ Prinzip. Dabei wird der Einbau der einzelnen Nukleotide in den neusynthetisierten DNA-Strang über unterschiedliche Verfahren gemessen und die Signale zu einer Sequenzabfolge zusammengestellt (MARDIS, 2008). Die Leselängen der resultierenden Sequenzen liegen in Abhängigkeit von der Methode bei 35-250 Basen. Mit Optimierungen konnten vereinzelt auch 347 bp lange Fragmente ausgelesen werden (YANG et al., 2010). Durch die Weiterentwicklung der Methode konnte der Probendurchsatz erhöht und damit der Nachweis von einzelnen Nukleotidaustauschen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) und small RNAs verbessert werden (NOVAIS et al., 2011). Oft wird beim NGS die 16S rRNA erfasst (AHMADIAN et al., 2006; DUGAT-BONY et al., 2011; NOVAIS et al., 2011). Bei der Auswertung der Ergebnisse muss auf vorhandene Sequenzen in Datenbanken zurückgegriffen werden, mit denen die Ergebnisse abgeglichen werden können. Daraus entsteht die Notwendigkeit, eine korrekte, qualitativ hochwertige Referenzsequenz zur Verfügung zu haben, mit der die Probensequenz verglichen werden



kann (DE LEENEER et al., 2011). Zusätzlich kann die Auswertung der Ergebnisse bei Deletionen oder Insertionen von Nukleotiden und bei Homopolymeren in der Probensequenz problematisch sein (DE LEENEER et al., 2011; MARDIS, 2008). Ebenso ist bei einigen Taq-Polymerasen eine bestimmte Fehlerrate bekannt (DE LEENEER et al., 2011). Die Auswirkungen dieser Fehlerrate müssen im Zusammenhang mit der resultierenden Sequenzierungslänge der NGS-Methode und der möglichen Sequenzierungsfehler bei der Spezieszuordnung jeweils bewertet werden (ROH et al., 2010).

## **4 DNA-Mikroarray/Gene-Chip**

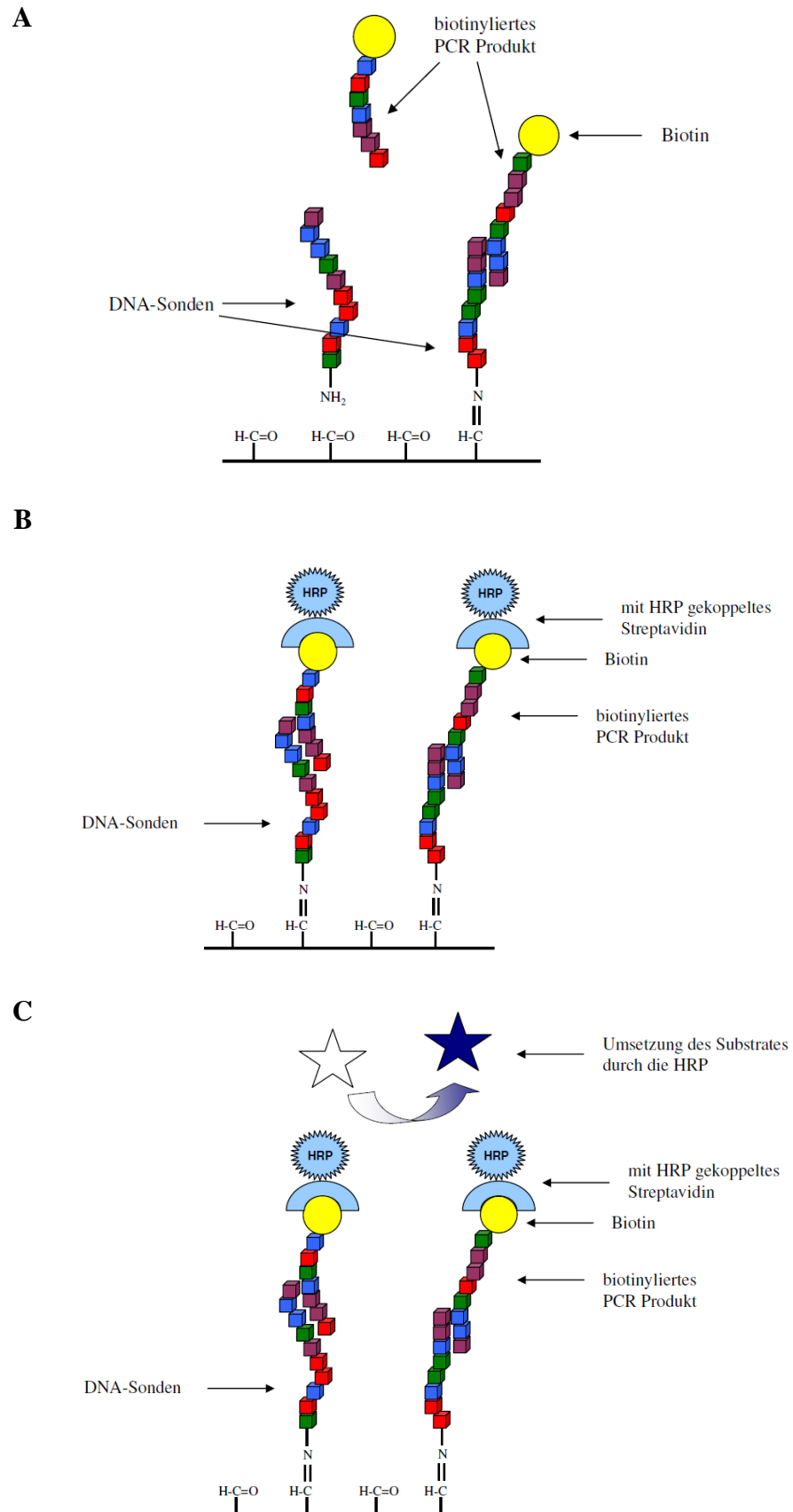
### **4.1 Allgemeiner Aufbau und Sondendesign des DNA-Mikroarrays**

Mikroarrays finden vor allem für Gen-Expressionsanalysen Einsatz, jedoch werden sie zunehmend auch für die Diagnostik von Pathogenen verwendet (ZHOU, 2003). Die Vorteile von Mikroarrays sind dabei ein kostengünstiger Nachweis ausgewählter Erreger, mit hoher Sensitivität und Spezifität (EHRICHT et al., 2006; ROH et al., 2010).

Bei DNA-Mikroarrays sind einzelsträngige DNA-Sequenzen, welche komplementär zu den gesuchten Erreger-Genen ausgewählt werden, auf der Oberfläche des Arrays immobilisiert (Abbildung 3 A). Die Länge der DNA-Sonden ist dabei abhängig vom Design des Arrays. Die Sensitivität kann durch die Verwendung längerer Sonden erhöht werden, gleichzeitig sinkt dabei aber die Spezifität. Kurze Sonden (15-25 bp) sind dagegen spezifischer als lange Sonden und erlauben unter optimalen Bedingungen auch die Unterscheidung einzelner Nukleotidpolymorphismen (CALL, 2005; DUGAT-BONY et al., 2011). Durch eine vor der Analyse laufende PCR wird eine hohe Sensitivität erreicht und in Kombination mit kurzen Sonden auf dem Array gleichzeitig eine hohe Spezifität gewährleistet (ROH et al., 2010).

Ein weiterer kritischer Parameter beim Design der Sonden ist die Uniformität der Sonden hinsichtlich des Hybridisierungsverhaltens, da für die unterschiedlichen Sondensequenzen die gleichen Hybridisierungsbedingungen während der Reaktionen bestehen (DUGAT-BONY et al., 2011). Das kann hauptsächlich mit einheitlichen Struktureigenschaften, wie Länge der Sonden, GC-Gehalt, Schmelztemperatur und Bindungskapazität erreicht werden. Zusätzlich sollte die Bildung von Sekundärstrukturen wie Hairpins oder Dimeren vermieden werden. Die nötige Spezifität kann durch BLAST-Analysen überprüft werden (DUGAT-BONY et al., 2011). Dabei sollten die Sonden mindestens 85-90 %

Übereinstimmung zu den gesuchten Sequenzen aufweisen, damit eine Hybridisierung stattfinden kann (CALL, 2005). Zur Steigerung der Sensitivität und Spezifität des Mikroarrays ist es praktikabel pro Erreger und Erregerspezies mehr als eine spezifische Sonde zu entwickeln. Die Analyse der hybridisierten Zielsequenzen kann, je nach Aufbau des Mikroarrays, über Fluoreszenz oder enzymatische Reaktionen, z. B. mittels Meerrettich-Peroxidase (HRP, horseradish peroxidase), durchgeführt werden (CALL, 2005; MONECKE et al., 2005).



**Abbildung 3: Schema von Mikroarrayaufbau und Hybridisierungsreaktion**

A: Hybridisierung , B: Bindung von HRP-Streptavidin, C: Färbung

## 4.2 DNA-Mikroarray ArrayTube™ (Alere Technologies GmbH)

Beim ArrayTube™ Format ist der DNA-Mikroarray in den Boden eines Tubes integriert (Abbildung 4). Dadurch besteht der Vorteil, dass alle Hybridisierungs- und Waschschrte in einem Gefäß durchgeführt werden können, wodurch die Gefahr von Kontaminationen vermindert wird. Beim DNA-Mikroarray werden die einzelsträngigen Oligonukleotid-Sonden während der Array-Synthese auf der Mikroarrayoberfläche fixiert. Durch eine 3'-Aminomodifikation der Sonden werden diese dabei kovalent auf der Array-Oberfläche, welche z. B. eine Epoxid- oder Aldehydmodifikation aufweist, immobilisiert. Zur Erhöhung der Nachweissicherheit wird jede Sonde dreifach gespottet. Zusätzlich werden Negativ- (Leerwert, Spotting-Puffer) und Positivkontrollen (Biotinmarker) zwischen die Sonden aufgebracht (Abbildung A 1 im Anhang).

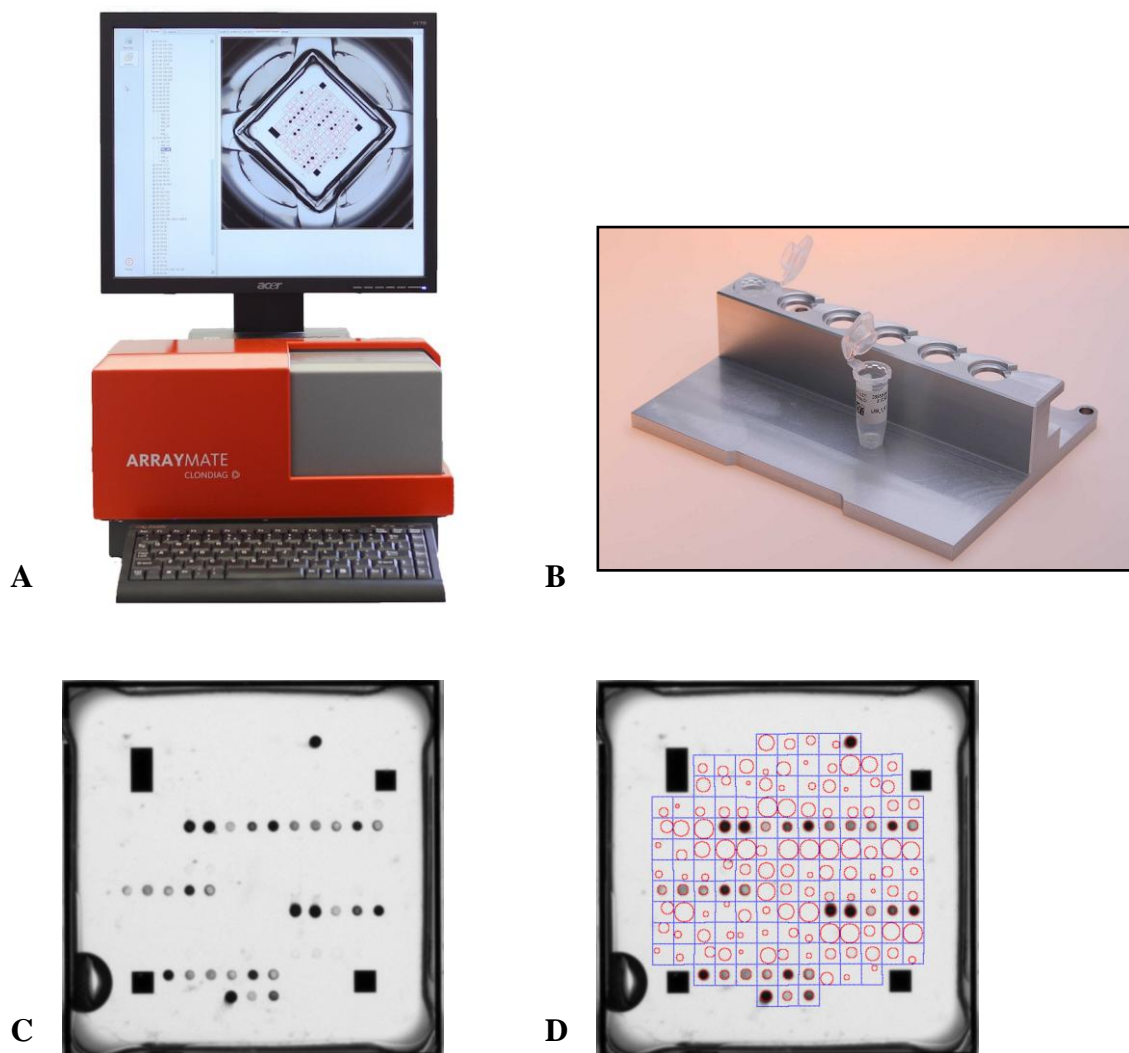
Für das ausgewählte Format wird der Hybridisierungsreaktion eine Multiplex-PCR vorgeschaltet, bei der am 5'-Ende biotinylierte Primer die PCR-Produkte markieren. Nach der Hybridisierung der biotinylierten PCR-Produkte an jeweils komplementäre Sonden wird in einem weiteren Schritt mit HRP konjugiertes Streptavidin auf den Array gegeben. Die Anfärbung der hybridisierten PCR-Produkte erfolgt dann über die Umsetzung eines Substrates, in der Regel TMB, durch die HRP (Abbildung 3).



**Abbildung 4: ArrayTube™**

Foto der Tubes © by Alexander Freiesleben

Die Auswertung der Hybridisierungsergebnisse erfolgt in einem Mikroarray Reader (ArrayMate Reader, Alere Technologies GmbH), in dem eine Transmissionsmessung der gefärbten Sonden/Spots durchgeführt wird. Dabei wird anhand der vier Markierungsfelder auf jedem Array ein Leseraster über die gefärbten Spots gelegt (Abbildung 5). Mit diesem werden die einzelnen Spots erfasst und Messungen der mittleren Färbung und des lokalen Hintergrundes ausgeführt. Gleichzeitig werden zur Vermeidung falschpositiver Messungen Artefakte wie Schlierenbildungen oder Verunreinigungen im Puffer bestimmt und von der Messung ausgeschlossen.



**Abbildung 5: Mikroarray-Analyse**

A und B: ArrayMate Reader für die Analyse der ArrayTubes™

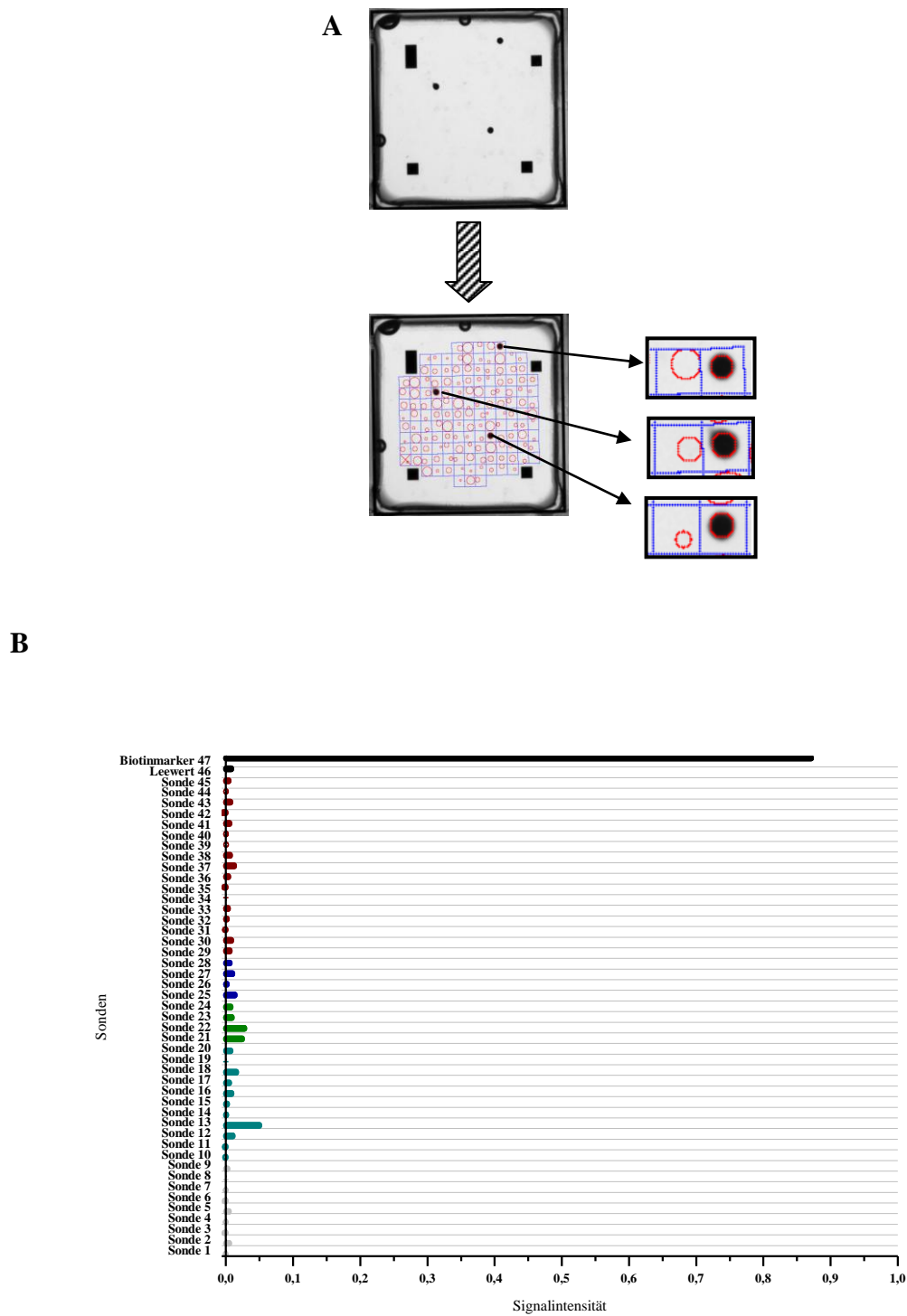
C und D: Auswertung eines Mikroarrays mit Leseraster

Fotos 5 A und B © by Alexander Freiesleben

Die Ergebnisse der Messungen werden in Signalintensitäten der Sonden nach folgender Formel berechnet:  $SI = 1 - \left( \frac{mean}{BG} \right)$ , SI = Signalintensität, mean = Mittelwert der

Spotintensität, BG = lokaler Hintergrund. Daraus ergeben sich Signalintensitäten zwischen 0 (kein Signal) und 1 (stärkstes Signal).

Zusätzlich muss die Qualität des jeweiligen Arrays, beurteilt anhand der Signalintensitäten der Biotinmarker (Positivkontrolle) und des Leerwertes (Negativkontrolle, Spotting-Puffer), in die Auswertung miteinbezogen werden (Abbildung 6). Bei zu hohen Werten ( $> 0,15$ ) des Leerwertes muss das Experiment wiederholt werden. Der Wert des Biotinmarkers sollte bei jedem Array  $> 0,5$  liegen, damit das Ergebnis ausgewertet werden kann.



**Abbildung 6: Auswertung des Mikroarrays und Analyse mittels Diagramm**

A: Auswertung des Mikroarrays mit Leseraster,

○ Leerwert (Negativkontrolle), ● Biotinmarker (Positivkontrolle)

B: Darstellung der Signalintensitäten desselben Mikroarrays mittels Diagramm

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1 Material

##### 1.1 Reagenzien und weitere Materialien

Eine Auflistung der für diese Arbeit verwendeten Reagenzien, weiterer Materialien und Programme findet sich in den Tabellen A 1 bis A 7 im Anhang.

##### 1.2 Probenmaterial

###### 1.2.1 Positivkontrollen für den Mikroarray

Als Positivkontrollen für alle durchgeführten Experimente wurden 11 verschiedene Erregerspezies verwendet. *Anaplasma phagocytophilum* (Webster Stamm) wurde ursprünglich aus dem Blut eines Patienten aus den USA isoliert. DNA von *Anaplasma platys* wurde aus einer klinischen Probe isoliert und freundlicherweise von Herrn Dr. Nikola Pantchev (Vet Med Labor GmbH, Division of IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. *Ehrlichia canis* wurde von einem Hund in Spanien isoliert und anschließend in der Zellkultur weiter vermehrt. Die *Ehrlichia-canis*-Probe wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Erich Zwegarth (Institut für vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der LMU München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. *Rickettsia helvetica* wurde aus *I. ricinus* isoliert. *Rickettsia conorii* (Brumpton Maroccan strain, VR-141TM ATCC<sup>®</sup>, LGC, Deutschland) und *Rickettsia helvetica* wurden in Vero E6 Zellen kultiviert. Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Rickettsien wurden als formalinisiertes Kulturmaterial freundlicherweise von Herrn Dr. Gerhard Dobler und Frau Dr. Stephanie Speck (Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland) bereitgestellt. Die Spezies *Borrelia garinii* Pbi (*Bbav*) (MARGOS et al., 2009) und *Borrelia afzelii* Pko sind Humanisolate (WILSKE et al., 1993) und wurden ursprünglich von Frau Dr. Bettina Wilske (Max von Pettenkofer-Institut, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Der in der Arbeit verwendete Stamm von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto N40 ist ein Isolat aus einem Hund, der experimentell durch Zecken infiziert wurde (APPEL et al., 1993). Die Positivkontrollen von *Babesia canis*, *Babesia vogeli* und *Babesia gibsoni* waren in Form von Plasmiden verfügbar, wobei die spezifische 18S rRNA in einen pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor kloniert war. Die Plasmide wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Edward Breitschwerdt und Herrn Prof. Adam



Birkenheuer (Department of Clinical Sciences, North Carolina State University, North Carolina, USA) zur Verfügung gestellt.

### 1.2.2 Proben zum Test der Spezifität

Um die entwickelte Multiplex-PCR und den Mikroarray auf Kreuzreaktionen zu testen, wurde die DNA von *Anaplasma (A.) marginale*, *Rickettsia (R.) honei*, *R. monacensis*, *Borrelia (B.) spielmanii* und Plasmid-DNA von *Babesia (B.) microti-like* in der Multiplex-PCR eingesetzt und die biotinylierten PCR-Produkte anschließend auf dem Mikroarray analysiert. Die DNA der *A.-marginale*-Probe wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Hans Lutz und Frau Dr. Marina Meli (Veterinärmedizinisches Labor, Universität Zürich, Schweiz) zur Verfügung gestellt. *B. spielmanii* (Stamm A14 S) wurde ursprünglich von Herrn Dr. Christian Epe (Institut für Parasitologie, Tierärztliche Hochschule, Hannover, Deutschland) zur Verfügung gestellt. *B. microti-like* wurde in Form von Plasmid-DNA freundlicherweise von Herrn Prof. Edward Breitschwerdt und Herrn Prof. Adam Birkenheuer (Department of Clinical Sciences, North Carolina State University, North Carolina, USA) bereitgestellt.

Um den Mikroarray zusätzlich validieren zu können, wurde die DNA von 10 spezifisch *Borrelia*-spp.-freien *I. ricinus* extrahiert und mit Multiplex-PCR und Mikroarray getestet. Die Zecken wurden freundlicherweise von Frau Dr. Dania Richter (Institut für Parasitologie, Charité Universitätsmedizin, Berlin, Deutschland) bereitgestellt.

### 1.2.3 Feldproben

Als Feldproben wurden Schildzecken (Familie der Ixodidae) eingesetzt, welche in Deutschland gesammelt wurden. Insgesamt wurde die DNA von 150 *I.-ricinus*- und von 175 *D.-reticulatus*-Zecken mittels Multiplex-PCR und Mikroarray untersucht. Alle *I.-ricinus*-Zecken wurden im Englischen Garten in München bzw. in der Region Grafrath, Fürstenfeldbruck bei München gesammelt und freundlicherweise von Herrn Dr. Volker Fingerle (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die *D.-reticulatus*-Zecken stammen aus verschiedenen Regionen Deutschlands (Großraum Leipzig, Berlin, Stuttgart, Cottbus und Wiesbaden) und wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Torsten Naucke (Institut für Zoologie, Abteilung Parasitologie, Universität Hohenheim, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

## 2 Methoden

### 2.1 DNA-Extraktion

Für die Herstellung von Positivkontrollen wurde die DNA aus Zellkulturen mit dem Qiagen Dneasy Blood and Tissue Kit nach Angaben des Herstellers extrahiert.

Die Zecken wurden zum besseren Aufschluss vor der Lyse mit Proteinase K versetzt und mit sterilen Metallbeads in einem Homogenisator zerkleinert. Nach Zugabe von 180 µl ATL-Puffer wurden die Proben über Nacht bei 56 °C und 550 rpm in einem Thermomixer inkubiert und anschließend die DNA aus den Zecken mit dem Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit nach Herstellerangaben extrahiert. Bei der DNA-Extraktion wurde nach jeder 10. Probe eine Negativkontrolle mit Aqua dest. eingesetzt, welche anschließend in der Multiplex-PCR getestet wurde.

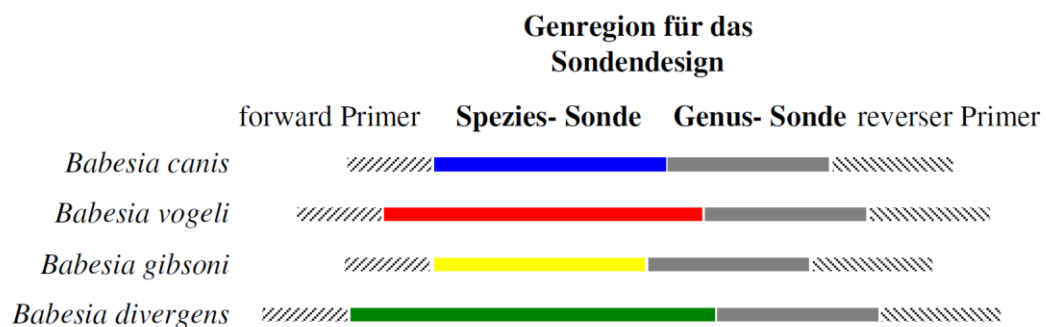
### 2.2 Auswahl der Zielgene und Primerdesign für die Multiplex-PCR

Für das Design des Mikroarrays wurden für jeden Erreger Gene ausgewählt, die eine spezifische Detektion und Differenzierung der Pathogene sowohl auf Genus- als auch auf Speziesebene ermöglichen (Abbildung 7). Dabei eignen sich besonders die Gene, die sowohl eine variable Region, und gleichzeitig möglichst hoch konservierte Genabschnitte aufweisen. In den variablen Genregionen können speziesspezifische Sonden festgelegt werden. Die konservierten Abschnitte bieten sich für das Design der genuspezifischen Sonden und der Primer an.

Insgesamt konnten unter den genannten Kriterien 5 Zielgene festgelegt werden (Tabelle 1). Von diesen Genen wurden alle, in öffentlichen Datenbanken (PubMed NCBI, GenBank) verfügbare Sequenzen herausgesucht (Tabelle A 8 im Anhang) und jeweils in multiplen Alignments zusammengestellt. Dabei wurden nicht nur die Sequenzen der spezifisch zu detektierenden Pathogene in die Alignments aufgenommen, sondern auch die verwandter Erregerspezies des gleichen Genus bzw. weiterer Pathogene, die auch von Zecken übertragen werden können. Mit der Erweiterung der Alignments um diese zusätzlichen Erreger wurde die Spezifität der Sonden erhöht und somit die Generierung falschpositiver Ergebnisse vermieden. Basierend auf diesen Alignments konnten durch Modifikationen aus in der Literatur beschriebenen Primern (Tabelle 1), unter Zuhilfenahme der Primer3Plus-Software, spezifische Primerpaare entwickelt werden, welche die ausgewählten Genregionen umfassen. Dabei wurden die Primer so gelegt, dass möglichst

alle in den Alignments vorhandenen Sequenzen amplifiziert werden. Für die Entwicklung der Multiplex-PCR wurde zusätzlich beachtet, dass die entstehenden PCR-Produkte der jeweiligen Erreger in der Größe um mindestens 30 bp von einander abweichen, damit diese auf dem Agarosegel klar aufgetrennt und unterschieden werden konnten. Die Primer wurden unter Beachtung einer einheitlichen Schmelztemperatur von  $66\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  (Konzentration monovalenter Kationen 50 mM, Konzentration divalenter Kationen 3 mM) und unter Vermeidung von Primerdimer-Formationen entwickelt. Durch die BLAST-Analyse (PubMed NCBI BLAST<sup>®</sup>) wurden theoretische Fehlhybridisierungen mit nicht in den Alignments verwendeten Erregern ausgeschlossen.

Bei der Validierung der Multiplex-PCR wurden alle Primer ohne Modifikationen eingesetzt. Für die Analyse mittels DNA-Mikroarray wurden dagegen biotinylierte Primer in der Multiplex-PCR verwendet. Die Primer wurden mit einer Biotin-Modifikation am 5'-Ende synthetisiert (Metabion GmbH, Martinsried, Deutschland). Eine Auflistung der verwendeten Primer findet sich in Tabelle 1.



**Abbildung 7: Schema des Sonden- und Primerdesigns**

als Beispiel das Alignment der 18S rRNA von *Babesia* spp., konservierte Abschnitten (grau) innerhalb des gleichen Genus, variable Abschnitte spezifisch für die jeweilige Spezies (bunt)

**Tabelle 1: Primer für die Multiplex-PCR**

<sup>a</sup>ohne Modifikation übernommen

Primer	Sequenz (5' → 3')	Gen	Größe (bp) Produkt	Detektion	modifiziert nach
<i>Anaplasma/Ehrlichia</i> -for	Bio-T/CTA ACA CAT GCA AGT CGA AC	16S rRNA	~ 405	Genus/Spezies	(BEALL et al., 2008)
<i>Anaplasma/Ehrlichia</i> -rev	Bio-GGT ACC GTC ATT ATC TTC C				(EDDLESTONE et al., 2007a)
<i>Babesia</i> -for	Bio-G/CTC TTG TAA TTG GAA TGA TGG	18S rRNA	~ 375	Genus/Spezies	(BIRKENHEUER et al., 2003)
<i>Babesia</i> -rev	Bio-CTA AGA ATT TCA CCT CTG ACA GT <sup>a</sup>				(GEORGES et al., 2001)
<i>Borrelia</i> -for	Bio-CCT TAA TAG CAT GT/CA AGC A	<i>ospA</i>	~ 290	Genus/Spezies	(RAUTER et al., 2002)
<i>Borrelia</i> -rev	Bio-CTA A/GTG TTT/G TGC CAT CTT CT				
<i>Rickettsia_ompB</i> -for	Bio-ACT GTT ACT ACA GGC GGT ATA G	<i>ompB</i>	~ 160	Spezies	(DOBEC et al., 2009)
<i>Rickettsia_ompB</i> -rev	Bio-TGC AC/TT ACC TAA ATA AGT TAC AG				(ROUX et al., 2000)
<i>Rickettsia_gltA</i> -for	Bio-GCA ATG TCT TAT AAA TAT TCT ATA GG	<i>gltA</i>	~ 240	Genus	(WÖLFEL et al., 2008)
<i>Rickettsia_gltA</i> -rev	Bio-AAG CAA AAG GGT TAG CTC				

### 2.3 Design der DNA-Sonden für den Mikroarray

Innerhalb der Genabschnitte, die von den Primern amplifiziert wurden, wurden spezifische Sequenzabschnitte als Sonden festgelegt. Unter Verwendung der Array Design Software (Alere Technologies GmbH, Deutschland) wurden dafür die erstellten Alignments mit einem sogenannten „most variable window“ analysiert. Dabei wurden schrittweise alle Nukleotide der in die Alignments einbezogenen Sequenzen auf einen Abschnitt mit optimaler Sondeneigenschaft geprüft. Mit dem Programm konnten einerseits Sonden erstellt werden, die spezifisch das Genus nachwiesen (Genus-Sonden = consensus Sonden), andererseits konnten Sequenzabschnitte festgelegt werden, mit denen ein spezifischer Nachweis der jeweiligen Spezies möglich war (Spezies-Sonden). Außer für die Sequenzen der Borrelien, für die im gewählten Genabschnitt keine genuspezifischen Sonden festgelegt werden konnten, wurden für alle anderen ausgewählten Erreger beide Sondenarten erstellt. Für jedes Genus und jede Spezies wurden dabei jeweils mehrere verschiedene Sonden entwickelt um die Spezifität und Sensitivität des Nachweises zu erhöhen.

Insgesamt wurden 45 Sonden erstellt und auf den Mikroarray gespottet (Tabelle 2, Abbildung A 1 im Anhang). Die Fixierung der Sonden mit der Epoxid-modifizierten Oberfläche des Mikroarrays erfolgte dabei über die Aminomodifikation ( $\text{NH}_2$ ) am 3'-Ende der Sonden bei deren Synthese (Metabion GmbH, Martinsried, Deutschland). Zur Erhöhung der Nachweissicherheit wurde jede Sonde dreifach auf einen Array gespottet. Zusätzlich wurden Triplikate einer Positivkontrolle (Biotinmarker) und einer Negativkontrolle (Leerwert, Spotting-Puffer) auf jeden Array gespottet um die Qualität und Funktion jedes einzelnen Arrays zu garantieren.

**Tabelle 2: Sondensequenzen des entwickelten DNA-Mikroarrays**

Nummer	Target	Sondenname	Sequenz 5' → 3'	Länge (bp)	Detektion
01	<i>Anaplasma/Ehrlichia</i>	consensus	ACG GTC CAG ACT CCT ACG GGA GGC	24	Genus
02	<i>Anaplasma</i>	<i>phagocytophilum, platys</i>	GGC AGA CGG GTG AGT AAT GCA TAG GAA TCT	30	Spezies
03	<i>Anaplasma</i>	spp.	ATT AGC TAG TTG GTA GGG TAA AGG CCT ACC AA	32	Spezies
04	<i>Ehrlichia</i>	<i>canis, ovina</i>	ATT AGC TAG TTG GTG AGG TAA TGG CTT ACC AA	32	Spezies
05	<i>Anaplasma</i>	<i>phagocytophilum, spp.</i>	ATA AAG AAT AGT TAG TGG CAG ACG GGT GAG TA	32	Spezies
06	<i>Anaplasma</i>	<i>platys</i>	ATG ATA AAA ATT AGT GGC AGA CGG GTG AGT AA	32	Spezies
07	<i>Anaplasma/Ehrlichia</i>	<i>phagocytophilum, spp.</i>	ATG AAG AAT AGT TAG TGG CAG ACG GGT GAG TA	32	Spezies
08	<i>Ehrlichia</i>	<i>canis, ovina</i>	ACG TTA GAT TAG CTA GTT GGT GAG GTA ATG GC	32	Spezies
09	<i>Anaplasma</i>	<i>platys, spp.</i>	TGT TAG ATT AGC TAG TTG GTA GGG TAA AGG CC	32	Spezies
10	<i>Babesia</i>	consensus	GGA GGG CAA GTC TGG TGC CAG CAG	24	Genus
11	<i>Babesia</i>	consensus	CGC GGT AAT TCC AGC TCC AAT AGC GTA TAT T	31	Genus
12	<i>Babesia</i>	<i>canis, vogeli</i>	GTG ACC CAA ACC CTC ACC AGA GTA GC	26	Spezies
13	<i>Babesia</i>	<i>vogeli</i>	GTG ACC CAC ACC CTC ACC AGA GTA GC	26	Spezies
14	<i>Babesia</i>	<i>gibsoni</i>	GGT GAC GTA AAA TCT CAC CAG AGT AAC AAT TGG	33	Spezies
15	<i>Babesia</i>	<i>canis, vogeli</i>	GAC CCA AAC CCT CAC CAG AGT AGC AAT TG	29	Spezies
16	<i>Babesia</i>	<i>canis</i>	GTT GAC GGT TTG ACC ATT TGG TTG GTT ATT TC	32	Spezies
17	<i>Babesia</i>	<i>vogeli</i>	TGT TCG AGT TTG CCA TTC GTT TGG CTT TTT C	31	Spezies
18	<i>Babesia</i>	<i>gibsoni</i>	CCC GAC TCG GCT ACT TGC CTT GTC TG	26	Spezies
19	<i>Babesia</i>	<i>canis</i>	GAC GGT TTG ACC ATT TGG TTG GTT ATT TCG T	31	Spezies
20	<i>Babesia</i>	<i>gibsoni</i>	AGC AGA CTT GTG TCT TGA ATA CTT CAG CAT GG	32	Spezies

Tabelle 2 (Fortsetzung): Sondensequenzen des entwickelten DNA-Mikroarrays

Nummer	Target	Sondenname	Sequenz 5' → 3'	Länge (bp)	Detektion
21	<i>Rickettsia</i>	<i>helvetica</i>	GTA ATT TTT GTT GAC GGT ACA AAC TCT ACT GC	32	Spezies
22	<i>Rickettsia</i>	<i>helvetica</i>	TTT TGT TGA CGG TAC AAA CTC TAC TGC TAC AA	32	Spezies
23	<i>Rickettsia</i>	<i>conorii</i>	TTG TTG ACG GTA TAT TGT CTC ATT CTA CAA GT	32	Spezies
24	<i>Rickettsia</i>	<i>conorii</i> , spp.	GGT AAC GGT AAT GTA AGA TTT GTT GAC GGT AT	32	Spezies
25	<i>Rickettsia</i>	<i>conorii</i> , spp.	TAC TTC AAC AGT CCG AAT TGC TGG C	25	Spezies
26	<i>Rickettsia</i>	spp.	ACC GAA AAT TTT CTG CAT ATG ATG TTT GCA AC	32	Genus
27	<i>Rickettsia</i>	spp.	GAA AAT TTT CTG CAT ATG ATG TTT GCA ACG CC	32	Genus
28	<i>Rickettsia</i>	<i>conorii</i> , spp.	CCT ACA TGC CGA TCA TGA GCA GAA TGC TTT TA	32	Spezies
29	<i>Borrelia</i>	<i>garinii</i> , bss, spp.	ACA GTA GAC AAG CTT GAG CTT AAA GGA ACT	30	Spezies
30	<i>Borrelia</i>	<i>garinii</i> , bss, spp.	ACG ATC TAA TTG CAA CAG TAG ACA AGC TTG	30	Spezies
31	<i>Borrelia</i>	<i>garinii</i> , bss, <i>valasiana</i> , spp.	AGA CAA GCT TGA GCT TAA AGG AAC TTC TGA	30	Spezies
32	<i>Borrelia</i>	<i>garinii</i> , bss, spp.	ACG ATC TAG GTC AAA CCA CAC TTG AAG TTT TC	32	Spezies
33	<i>Borrelia</i>	<i>garinii</i> , spp.	CAA CGG TTC TGG AAC ACT TGA AGG TGA	27	Spezies
34	<i>Borrelia</i>	<i>garinii</i> , spp.	ATA CAG TCT AGA GGC AAC AGT AGA CAA GCT T	31	Spezies
35	<i>Borrelia</i>	<i>garinii</i> , spp.	ATA CAG TCT AAT GGC AAC AGT AGA CAA GCT AG	32	Spezies
36	<i>Borrelia</i>	<i>garinii</i> , bss, spp.	CAA GTA CGA TCT AAT TGC AAC AGT AGA CAA GC	32	Spezies
37	<i>Borrelia</i>	<i>garinii</i> , bss, spp.	GGC AAG TAC GAT CTA ATT GCA ACA GTA GAC	30	Spezies
38	<i>Borrelia</i>	<i>garinii</i> , bss, spp.	GAT CTA ATT GCA ACA GTA GAC AAG CTT GAG C	31	Spezies
39	<i>Borrelia</i>	<i>afzelii</i> , spp.	AGT ACA GTC TAA AGG CAA CAG TAG ACA AGA TT	32	Spezies
40	<i>Borrelia</i>	<i>afzelii</i>	CTG ACG ATC TAA GTA AAA CCA CAT TCG AAC TT	32	Spezies

**Tabelle 2 (Fortsetzung): Sondensequenzen des entwickelten DNA-Mikroarrays**

<b>Nummer</b>	<b>Target</b>	<b>Sondenname</b>	<b>Sequenz 5' → 3'</b>	<b>Länge (bp)</b>	<b>Detektion</b>
41	<i>Borrelia</i>	<i>afzelii</i> , spp.	GGG TGC TTG AAG GTA CAA AAG ATG ACA AAA GT	32	Spezies
42	<i>Borrelia</i>	<i>afzelii</i>	GAC AAT GGT TCT GGG GTG CTT GAA GGT AC	29	Spezies
43	<i>Borrelia</i>	<i>garinii, valaisiana</i> , spp.	GTT CTT GTA AGC AAA GAA AAA GAC AAA GAC GG	32	Spezies
44	<i>Borrelia</i>	<i>spielmanii</i>	AAA ATG ATG GTT CTG GTG TAC TGG AAG GC	29	Spezies
45	<i>Borrelia</i>	<i>spielmanii</i>	TGA TGG TTC TGG TGT ACT GGA AGG CG	26	Spezies
46	Leerwert (Negativkontrolle, Spotting-Puffer)				
47	Biotinmarker (Positivkontrolle)				



## 2.4 Klonierung und Sequenzierung

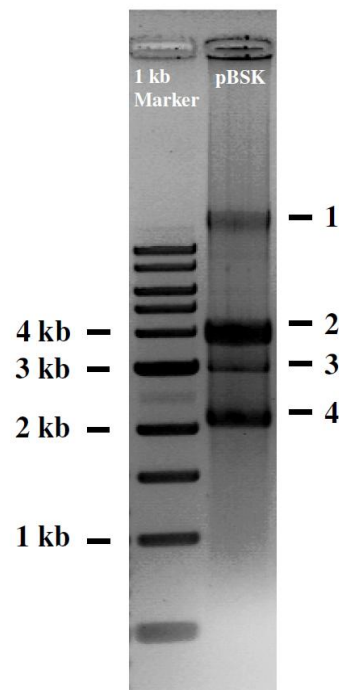
### 2.4.1 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen für die nachfolgenden Klonierungen wurde eine Einzelkolonie von *Escherichia coli* (XL1-Blue MRF' superkompetente Zellen) in 50 ml LB-Medium bei 250 rpm und 37 °C über Nacht bebrütet. Am nächsten Tag wurden 4 ml der Kultur in einen 1 Liter Glasflakon mit 400 ml LB-Medium überführt und unter Schütteln (250 rpm) bei 37 °C bis zur frühen Log-Phase ( $OD_{590} = 0,375$ ) angezüchtet. Die Kultur wurde auf acht vorgekühlte 50-ml Falkons aufgeteilt und für 10 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Kulturen bei 1600 x g und 4 °C für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in jeweils 10 ml eiskalter  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Die Ansätze wurden bei 1100 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets jeweils wieder in 10 ml eiskalter  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis gestellt und dann erneut bei 1100 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 2 ml eiskalter  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und anschließend 24 h auf Eis gestellt. Die Zellen wurden jeweils zu 250 µl aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

### 2.4.2 Herstellung des pBSK-Vektors

Für die nachfolgenden Klonierungen wurde ein Klonierungsvektor hergestellt, in den die ausgewählten Genabschnitte der Positivkontrollen inseriert wurden. Zur Herstellung und Vermehrung des Klonierungsvektors wurde der vorhandene pBlueskript® II SK Phagemid Vektor in die XL1-Blue MRF' superkompetenten Zellen, modifiziert nach Herstellerangaben, transformiert. Dazu wurden 50 µl kompetente Zellen mit 0,8 µl β-Mercaptoethanol vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl pBSK-Vektor wurde der Transformationsansatz für 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Ansatz für 45 sek bei 42 °C inkubiert und danach sofort wieder auf Eis gestellt und für 2 min abgekühlt. Nach Zugabe von 900 µl SOC-Medium, welches auf 42 °C vorgewärmt war, wurde der Transformationsansatz für 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert, auf einer LB-Amp-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Die Anzucht der Kolonien erfolgte ohne Blau-Weiß Selektion. Am folgenden Tag wurden einzelne Kolonien gepickt und jeweils in 8 ml LB-Amp-Medium über Nacht bei 37 °C und unter

Schütteln bei 140 rpm angezuchtet. Je 3 ml dieser Übernachtskulturen wurden bei 10000 x g für 2 min abzentrifugiert und das Plasmid durch alkalische Lyse des Pellets extrahiert. Hierfür wurde das Pellet in 100 µl Lösung I resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung II zur Lyse der Bakterienzellen zugegeben und der Ansatz vorsichtig gemischt. Das in der Lösung vorhandene NaOH denaturierte dabei die chromosomale und Plasmid-DNA. Durch Zugabe der kaliumacetathaltigen Lösung III, wurde die ringförmige Plasmid-DNA wieder renaturiert, während die chromosomale DNA aus den Bakterienzellen ausfiel. Nach Zentrifugation bei 15000 x g für 20 min wurde der Überstand, in dem die Plasmid-DNA gelöst war, abgenommen und mit 300 µl Isopropanol gemischt. Die ausgefallene Plasmid-DNA wurde dann bei 15000 x g für 5 min zentrifugiert und das Pellet 2-mal mit jeweils 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, um Salz- und Isopropanolreste zu entfernen, und anschließend luftgetrocknet. Das gereinigte Pellet wurde in TE-Puffer aufgelöst und mit 2 µl RNase A versetzt. Der Ansatz wurde auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (Abbildung 8).



**Abbildung 8: 1 %iges Agarosegel des aufgereinigten pBSK-Vektors**

- 1: genomische DNA
- 2: Plasmid-DNA: offenkettige Form
- 3: Plasmid-DNA: lineare Form
- 4: Plasmid-DNA: supercoil Form

Die restlichen 5 ml der Übernachtskultur wurden in 50 ml LB-Amp-Medium überführt und 5 Stunden bei 37 °C unter Schütteln bebrütet, bis eine optische Dichte von  $OD_{600} = 0,8$  erreicht war. Die Kultur wurde anschließend mit dem QIAfilter Plasmid Midi Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Der aufgereinigte Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRV linearisiert. Dabei wurden pro 1 µg Plasmid-DNA 5 Units des Restriktionsenzym eingesetzt. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 4 h inkubiert und das Enzym anschließend durch 20-minütiges Erhitzen des Ansatzes auf 80 °C inaktiviert. Die linearisierte Plasmid-DNA wurde auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Ausschneiden aus dem Gel wurde die Vektor-DNA mit dem peqGold Gel Extraction Kit aufgereinigt und in einer PCR eingesetzt, mit der Thymin-Überhänge an den Vektor angehängt wurden (MARCHUK et al., 1991). Folgender Ansatz wurde in einem Volumen von 100 µl durchgeführt: 1 Unit *Taq* DNA Polymerase (Fermentas) pro 1 µg Plasmid-DNA, 2mM dTTP, 1x Puffer (ohne  $MgCl_2$ , Fermentas), 1,5 mM  $MgCl_2$  und 4,7 µg pBSK-Vektor. Die PCR-Reaktion lief für 2 h bei 70 °C. Nach Auftrennung des PCR-Produkts über ein 1 %iges Agarosegel und Extraktion aus dem Gel (peqGold Gel Extraction Kit) wurde der fertige Vektor bei -20 °C gelagert.

### 2.4.3 Herstellung der Positivkontrollen

Die Positivkontrollen für die verschiedenen *Babesia*-Erreger waren bereits als Plasmide verfügbar. Dabei war die 18S rRNA jeweils in einen pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor ligiert.

Für die Herstellung aller anderen Positivkontrollen wurden die ausgewählten Gene mit den jeweiligen Primern in einer Einzel-PCR amplifiziert. In einem Reaktionsvolumen von 25 µl wurden 0,5 mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM dNTP, 1x Puffer (mit  $MgCl_2$ , Fermentas), 0,5 Units *Taq* DNA Polymerase (Fermentas), je 300 nM Primer und 20-100 ng genomische Template-DNA eingesetzt. Folgende Reaktionsbedingungen ermöglichten eine Amplifikation der jeweiligen Zielsequenzen: Initiale Denaturierung bei 95 °C für 2 min; 35 Zyklen Denaturierung für 30 sek bei 95 °C, Annealing der Primer für 45 sek bei 60 °C und Elongation für 30 sek bei 72 °C; finale Elongation für 5 min bei 72 °C. Zur Prüfung der korrekten Amplifikation wurden die PCR-Produkte auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt und durch Anfärben im GelRed<sup>TM</sup>-Färbebad sichtbar gemacht. Die PCR-Produkte wurden aus dem Gel aufgereinigt (peqGold Gel Extraction Kit) und mit der T4 DNA Ligase in einen pBSK-Vektor ligiert. Dafür wurden jeweils die molaren Massen der PCR-Produkte über eine Software (Praktische Molekularbiologie) berechnet und im

Verhältnis 5:1 zum Vektor angesetzt. Der Ansatz erfolgte mit 2 µl des 10x T4 DNA Ligase Puffers, 1 µl T4 DNA Ligase und Aqua dest. ad 20 µl und wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Die Plasmide wurden anschließend in XL-1 Blue MRF<sup>+</sup> kompetente Zellen nach Herstellerangaben transformiert. Nach dem Anwachsen auf LB-Amp-Platten mit IPTG und X-Gal wurden einzelne Kolonien, die durch  $\alpha$ -Komplementation (Blau-Weiß Selektion) bereits vorselektiert waren, in einer Kolonien-PCR überprüft. Dafür wurden die einzelnen Kolonien in 100 µl LB-Bouillon für 1 h bei 37 °C und 550 rpm angezüchtet. Von der bebrüteten Bouillon wurden 5 µl mit 1x Puffer (mit MgCl<sub>2</sub>, Fermentas), 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,5 Units *Taq* DNA Polymerase (Fermentas) und je 300 nM der Standard-Primer T3 (5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA-3') und T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') in einer PCR angesetzt. Folgendes Temperaturprotokoll wurde verwendet: initiale Denaturierung für 2 min bei 95 °C; 30 Zyklen Denaturierung für 30 sek bei 95 °C, Annealing für 30 sek bei 58 °C und Elongation für 30 sek bei 72 °C; finale Elongation für 5 min bei 72 °C. Die PCR-Produkte wurden über ein 3 %iges Gel aufgetrennt. Klone, die das Insert richtiger Größe enthielten, wurden in 5 ml frischem LB-Medium angezüchtet. Die Plasmide wurden aus den Flüssigkulturen mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I extrahiert und durch Sequenzierung mit den Standard-Primern T3 und T7 auf die richtige Sequenz geprüft (Eurofins MWG Operon, Deutschland).

Für die weitere Verwendung als Positivkontrollen wurden die Plasmide mit den blunt-end-Restriktionsenzymen *ScaI* bzw. *HincII* linearisiert, wobei für 1 µg Plasmid jeweils 10 Units des Enzyms aktiviert wurden. Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt und inkubierten bei 37 °C für 120 min mit abschließender Inaktivierung des Enzyms bei 80 °C bzw. 60 °C für 20 min. Die Restriktionsenzyme wurden so ausgewählt, dass das Enzym nicht in der multiple cloning site des Vektors schnitt und das Insert im linearisierten Vektor möglichst mittig zu liegen kam. Für das Plasmid mit dem *ospA*-Gen von *Bbss* wurde dafür das Enzym *HincII* eingesetzt, für alle anderen Plasmide das Enzym *ScaI*. Die linearisierten Plasmide wurden anschließend über ein 2 %iges Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel extrahiert (peqGold Gel Extraction Kit) und bei -20 °C gelagert.

### 3 Etablierung der Multiplex-PCR-Methode

Die Multiplex-PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 25 µl durchgeführt (Tabelle 3). Der Primer-Mix wurde so konzipiert, dass alle Primer in equimolaren Mengen vorlagen.

**Tabelle 3: Multiplex-PCR, Reaktionsansatz**

Reagenz	Konzentration
genomische Template-DNA	20-100 ng
<i>Taq</i> Standard Puffer (mit MgCl <sub>2</sub> , NEB)	2 x
dNTPs	0,2 mM
<i>Taq</i> DNA Polymerase (NEB)	0,5 Units
10x Primer-Mix	200 nM
Aqua dest.	

In der Entwicklungs- und Optimierungsphase der PCR liefen alle Ansätze mit einem Temperaturgradienten der Annealingtemperatur von 54-62 °C in 2 °C-Schritten, um einerseits eine möglichst hohe Spezifität der PCR durch eine hohe Annealingtemperatur zu erreichen und gleichzeitig die Amplifikation aller eingesetzten Template-DNAs zu gewährleisten. Das in Tabelle 4 dargestellte PCR-Protokoll ermöglichte die Amplifikation der jeweils eingesetzten DNA mit der höchsten Spezifität.

**Tabelle 4: PCR-Protokoll Multiplex-PCR**

Zyklenanzahl	PCR-Phase	Temperatur	Zeit
1	initiale Denaturierung	95 °C	2 min
	Denaturierung	95 °C	30 sek
35	Annealing	58 °C	60 sek
	Elongation	72 °C	60 sek
1	finale Elongation	72 °C	5 min

In jeder Reaktion diente DNA-freies Aqua dest als Negativkontrolle. Zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation wurden die PCR-Produkte auf einem 3 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit GelRed<sup>TM</sup> visualisiert.

Für die Etablierung der Multiplex-PCR-Methode und zur Optimierung des PCR-Protokolls wurden zuerst Single-PCRs mit einer Positivkontrolle im PCR-Ansatz durchgeführt. Im Folgenden wurde die Anzahl der Erreger-DNA über Duplex- und Triplex- hin zur Multiplex-PCRs gesteigert. Dabei wurde die zu amplifizierende Erreger-DNA in den Kombinationen dem PCR-Ansatz zugegeben, die für die verschiedenen Zeckenarten beschrieben sind (Tabelle A 9 im Anhang).

## 4 Hybridisierungsprotokoll und Mikroarray-Analyse

Um die biotinylierten PCR-Produkte auf den Mikroarray zu hybridisieren, wurde das Standardprotokoll für Hybridisierungsreagenzien der Firma Alere Technologies GmbH im Verlauf der Optimierung zu dem in Tabelle 5 beschriebenen Protokoll abgeändert.

**Tabelle 5: Hybridisierungsprotokoll Mikroarray**

<sup>a</sup> Molecular Biology Reagent

<sup>b</sup> 1:100 verdünnt

<b>Vorbereitung</b>			<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
Denaturierung: 10 µl PCR-Produkt + 90 µl C <sub>1</sub> -Puffer			95 °C	5 min
<b>Mikroarray</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>		
Waschen	Aqua dest. <sup>a</sup>	500 µl		
Waschen	C <sub>1</sub> -Puffer	200 µl	55 °C	4 min
Hybridisierung denaturierter PCR-Produkte			57 °C	60 min
Waschen	C <sub>2</sub> -Puffer	500 µl	47 °C	10 min
Waschen	C <sub>2</sub> -Puffer	500 µl		
Bindung der HRP	C <sub>3</sub> -/C <sub>4</sub> -Puffer <sup>b</sup>	100 µl	30 °C	10 min
Waschen	C <sub>5</sub> -Puffer	2 x 500 µl		
Färben	Lösung D <sub>1</sub>	90 µl	30 °C	5 min

Das doppelsträngige PCR-Produkt wurde zunächst denaturiert. Die Trennung der Doppelstränge ermöglichte eine bessere Hybridisierung mit der passenden Sonde. Nach der Denaturierung wurde die Probe auf Eis gestellt und abgekühlt. Das Waschen des Mikroarrays vor der Hybridisierung wurde durchgeführt, um eventuell vorhandenen Schwebstoffen zu entfernen. Die Inkubation mit C<sub>1</sub>-Puffer blockierte unspezifische Bindungsstellen. Während der Hybridisierung binden die hauptsächlich vorhandenen einzelsträngigen PCR-Produkte an die jeweils komplementäre Sonde auf dem Array. Der C<sub>3</sub>-Puffer enthält die Streptavidin-konjugierte HRP, während der Konjugationspuffer C<sub>4</sub> blockierende Substanzen beinhaltet, die unspezifische Bindungen vermeiden sollen. Lösung D<sub>1</sub> enthält ein Substrat für die HRP, wodurch eine Anfärbung der spezifisch gebundenen PCR-Produkte erreicht werden kann. Der Mikroarray wurde innerhalb von 5 min mit dem ArrayMate Reader analysiert und ausgelesen (Abbildung 5, Seite 26).

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte anhand sogenannter Match-Tabellen (Tabellen A 10 im Anhang). Diese Tabellen sind eine Gegenüberstellung aller Sonden zu den für die Alignments verwendeten Sequenzen. Aus der Gegenüberstellung konnte für jede Spezies ein Muster derjenigen Sonden zusammengestellt werden, welche die geringste Anzahl an Mismatches (Diskrepanzen der überprüften Sequenzen) für die speziesspezifischen Sequenzen aufwiesen. Bei der Analyse der Proben konnten die Sonden, die mit der

Signalintensität über dem Cut-off lagen, mit den spezifischen Sonden-Mustern verglichen und die Erregergenera und –spezies abgelesen werden.

## **5 Sensitivitätsmessung und Festlegung des Cut-offs für die Sonden**

Um die Sensitivität des Mikroarrays zu prüfen, wurden die Konzentrationen der klonierten und linearisierten Positivkontrollen mittels Photometer bestimmt. Anschließend wurde diese mittels einer Software (Praktische Molekularbiologie) auf die jeweilige Anzahl der Plasmidkopien umgerechnet (Tabelle 6). Auf Grundlage dieser Berechnungen wurden alle Positivkontrollen auf eine Kopienzahl von  $1 \times 10^9$  eingestellt und Verdünnungsreihen angesetzt, wobei jeweils eine 1:10 Verdünnung mit Aqua dest. (Molecular Biology Reagent) erfolgte. Jeweils 1  $\mu$ l der verdünnten Positivkontrollen wurde in der Multiplex-PCR eingesetzt, die Produkte auf einem 3 %igen Agarosegel überprüft und ausgewählte Verdünnungsstufen mittels Mikroarray analysiert. Dabei wurden insbesondere die Verdünnungsstufen für die Mikroarray-Analysen ausgewählt, welche auf dem Gel gerade noch oder nicht mehr sichtbar waren, um den Vergleich von Agarosegel und Mikroarray hinsichtlich der Sensitivität herauszustellen.

Durch die Analysen der Sensitivität und weiterführende Experimente konnte ein empirischer Wert festgelegt werden, ab dem die Sonden signale als positiv gewertet wurden (Cut-off).

**Tabelle 6: Berechnung der Kopienanzahl der Positivkontrollen**

Genus	Spezies	kloniertes Gen	Konzentration ng/ $\mu$ l	Größe des Inserts (bp)	Größe von Insert und Vektor	Vektor	Anzahl Moleküle
<i>Anaplasma</i>	<i>phagocytophilum</i>	16S rRNA	23,74	405	3,405	pBSK	6,5 x10 <sup>9</sup>
	<i>platys</i>	16S rRNA	14,39	403	3,403	pBSK	3,9 x10 <sup>9</sup>
<i>Ehrlichia</i>	<i>canis</i>	16S rRNA	10,95	408	3,408	pBSK	2,7 x10 <sup>9</sup>
<i>Babesia</i>	<i>gibsoni</i>	18S rRNA	7,29	371	3,386	pGEM <sup>®</sup> -T Easy	2,0 x10 <sup>9</sup>
	<i>canis</i>	18S rRNA	14,34	373	3,388	pGEM <sup>®</sup> -T Easy	3,9 x10 <sup>9</sup>
	<i>vogeli</i>	18S rRNA	21,09	374	3,389	pGEM <sup>®</sup> -T Easy	5,8 x10 <sup>9</sup>
<i>Borrelia</i>	<i>afzelii</i>	<i>ospA</i>	17,40	291	3,291	pBSK	4,9 x10 <sup>9</sup>
	<i>garinii</i>	<i>ospA</i>	37,65	291	3,291	pBSK	10,4 x10 <sup>9</sup>
	<i>burgdorferi sensu stricto</i>	<i>ospA</i>	22,37	291	3,291	pBSK	6,3 x10 <sup>9</sup>
<i>Rickettsia</i>	<i>helvetica</i>	<i>gltA</i>	10,71	235	3,235	pBSK	3,1 x10 <sup>9</sup>
		<i>ompB</i>	10,49	171	3,171	pBSK	3,1 x10 <sup>9</sup>
	<i>conorii</i>	<i>gltA</i>	14,17	235	3,235	pBSK	4,1 x10 <sup>9</sup>
		<i>ompB</i>	16,52	171	3,171	pBSK	4,8 x10 <sup>9</sup>



## 6 Analyse der Spezifität des Mikroarrays

Um falschpositive Hybridisierungsreaktionen auf dem Mikroarray durch verwandte, von Zecken übertragene Erreger auszuschließen, wurde die DNA der folgenden Pathogene mit der Multiplex-PCR amplifiziert und die biotinylierten PCR-Produkte auf dem Array analysiert: *A. marginale*, *R. honei*, *R. monacensis*, *B. spielmanii* und *B. microti-like*. Zusätzlich wurde die DNA von 10 spezifisch *Borrelia*-spp.-freien *I. ricinus* mit Multiplex-PCR und Mikroarray getestet.

## 7 Analyse der Feldproben

Insgesamt wurden 150 *I.-ricinus*- und 175 *D.-reticulatus*-Zecken mittels Multiplex-PCR und DNA-Mikroarray analysiert.

Zur Bestätigung der Mikroarray-Ergebnisse wurden die *I.-ricinus*-Proben, welche positiv für *Borrelia* spp. waren, mit einer bereits beschriebenen *ospA* real-time PCR überprüft (KRUPKA et al., 2009; STRAUBINGER, 2000b). Die veröffentlichten Oligonukleotide waren für *B. afzelii* die Primer BaPKo-OspA-F 5'-AAA ATG TTA GCA GCC TTG ATG AA-3' und BaPKo-OspA-R 5'-GAC TGT ACT TAC CGT CTT TGT CTT-3', für *B. garinii* BgPBi-OspA-F 5'-AAA TGT TAG CAG CCT TGA TGA AA-3' und BgPBi-OspA-R 5'-GAC TGT AAT TAC CAT CTT TGT CTT T-3', für *Bbss* BBssN40-OspA-F 5'-AAT GTT AGC AGC CTT GAC GAG AA-3' und BBssN40-OspA-R 5'-GAT CGT ACT TGC CGT CTT TGT TT-3', und die Sonde 5'-FAM-AAC AGC GTT TCA GTA GAT TTG CCT GGT GA-TAMRA-3'. Die Oligonukleotide wurden bei Eurofins MWG Operon, Deutschland synthetisiert.

Als Positivkontrollen wurde die DNA von *B. afzelii* Pko, *B. garinii* Pbi (*Bbav*) und *Bbss* N40 eingesetzt, die aus jeweils 10<sup>5</sup> Spirochäten extrahiert wurde. Jede Zecken-Probe wurde in Triplikaten getestet.

## 8 Analyse unspezifischer Signale in den Feldproben

Bei der Untersuchung der DNA von *I. ricinus* und *D. reticulatus* mittels Multiplex-PCR war bei 70,3 % der Proben von *D. reticulatus* und bei 64,7 % von *I. ricinus* eine unspezifische Bande von etwa 400 bp Größe auf dem Agarosegel sichtbar. Um die Bande

weiter zu charakterisieren, wurden die im Folgenden beschriebenen zusätzlichen Untersuchungen angewandt.

### 8.1 Real-time PCR

Zur Differenzierung zu *Ap* wurde eine bereits beschriebene real-time PCR zur Detektion des *mSP2*-Gens durchgeführt (COURTNEY et al., 2004). Die forward Primer ApMSP2f 5'-ATG GAA GGT AGT GTT GGT TAT GGT ATT-3' und der reverse Primer ApMSP2r 5'-TTG GTC TTG AAG CGC TCG TA-3' amplifizierten dabei ein etwa 77 bp großes Zielfragment. Durch die Sonde ApMSP2p 5'-FAM-TGG TGC CAG GGT TGA GCT TGA GAT TG-TAMRA-3' wurde die spezifische Detektion des *mSP2*-Gens von *Ap* ermöglicht. Die beschriebenen Oligonukleotide wurden bei Eurofins MWG Operon, Deutschland synthetisiert. Folgende Reagenzien wurden in einem 25 µl Ansatz eingesetzt: 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 1x GeneAmp PCR Gold Buffer, 0,75 Units AmpliTaq<sup>®</sup> Gold DNA Polymerase, 0,3x ROX, je 300 nM Primer und 200 nM Sonde. Für die Reaktionen wurde jeweils 15-50 ng DNA von vier verschiedenen *D.-reticulatus*-Zecken als Template verwendet. Die real-time PCR lief mit folgendem Temperaturprotokoll: 10 min bei 95 °C; 40 Zyklen bei 95 °C für 15 sek und 60 °C für 60 sek (COURTNEY et al., 2004).

Die DNA von *Ap*, angezüchtet in einer HL60-Zellkultur (human myeloid leukemia cells), wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in DNA von HL60-Zellen als Positivkontrolle eingesetzt und ergab einen durchschnittlichen C<sub>t</sub>-Wert von 25,92 (25,81-25,99). Jede der vier Zecken-Proben wurde in Triplikaten getestet.

### 8.2 Untersuchung mittels Mikroarray

Die biotinylierten PCR-Produkte von *D. reticulatus* und *I. ricinus*, bei deren Analyse auf dem Agarosegel die etwa 400 bp große Bande sichtbar war, wurden mittels Mikroarray getestet.

### 8.3 Multiplex-PCR und Sequenzierung

Zur weiteren Untersuchung der unspezifischen, etwa 400 bp großen Bande der Zecken-DNA wurde eine *D.-reticulatus*-Probe in einem 4fachen Ansatz (4 x 25 µl) mit der unter Kapitel 3 beschriebenen Multiplex-PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf einem 3 %igen Agarosegel aufgetrennt und für die Sequenzierung aus dem Gel aufgereinigt

(peqGold Gel Extraction Kit). Die Sequenzierung (Eurofins MWG Operon, Deutschland) erfolgte mit den entwickelten 16S rRNA-Primern der Multiplex-PCR.

#### 8.4 PCR der 16S rRNA und Sequenzierung

Um die Ergebnisse der Sequenzierung aus 8.3 verifizieren zu können, wurde die gleiche DNA-Probe von *D. reticulatus* in einer PCR eingesetzt, mit der ein Abschnitt von etwa 1444 bp der 16S rRNA amplifiziert werden kann. Forward (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') und reverse Primer (5'-CGG CTA CCT TGT TAC GAC TT-3') (ZHOU et al., 2010), synthetisiert bei Eurofins MWG Operon, Deutschland, wurden in einer 50 µl Reaktion in einer Konzentration von je 300 nM mit 0,2 mM dNTP, 1x Pwo-Reaktionspuffer mit 2,0 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 Unit Pwo-Polymerase und 100 ng der Template-DNA angesetzt. Die Pwo-Polymerase (aus *Pyrococcus woesei*) besitzt eine zusätzliche 3'→5'- Exonuklease-Aktivität (proof reading). Mit dieser Aktivität ist die Fehlerquote bei der Amplifikation reduziert und ermöglicht eine genauere Aussage der Sequenzierergebnisse. Folgendes Temperaturprotokoll ermöglichte die Amplifikation der Template-DNA: initiale Denaturierung für 2 min bei 94 °C; 30 Zyklen mit 30 sek Denaturierung bei 94 °C, Annealing für 45 sek bei 64 °C und Elongation für 90 sek bei 68 °C; finale Elongation für 5 min bei 68 °C. Das PCR-Produkt wurde anschließend auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt und nach Extraktion aus dem Gel (peqGold Gel Extraction Kit) mit den für die PCR verwendeten 16S rRNA-Primern sequenziert (Eurofins MWG Operon, Deutschland).

#### 8.5 Klonierung und Sequenzierung

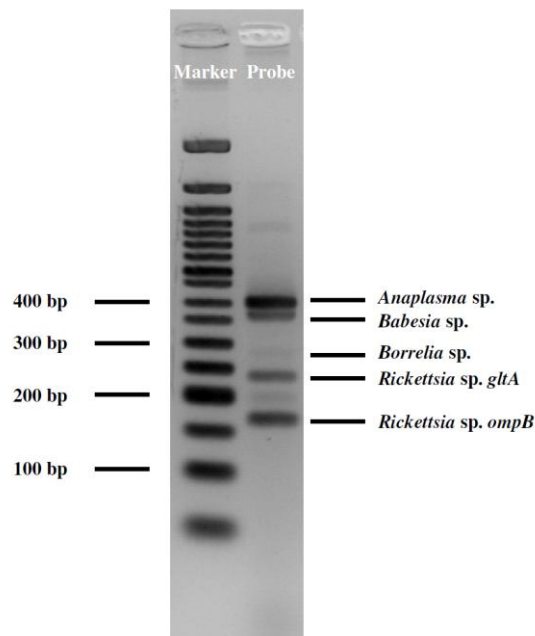
Zur Klonierung der unspezifischen Banden wurde ein 4facher Ansatz (4 x 25 µl) mit DNA von jeweils *D. reticulatus* bzw. *I. ricinus* in der in Kapitel 3 beschriebenen Multiplex-PCR angesetzt. Die PCR-Produkte wurden über ein 2 %iges Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel aufgereinigt (peqGold Gel Extraction Kit). Mit der unter Kapitel 2.4.3 beschriebenen Klonierungsmethode wurden die etwa 400 bp großen Fragmente in einen pBSK-Vektor ligiert und anschließend in XL1-Blue MRF' superkompetente Zellen transformiert. Die das Insert der richtigen Größe enthaltenden Klone wurden in LB-Amp-Medium angezüchtet und nach Aufreinigung des Plasmids (peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I) mit den Standard-Primern T3 und T7 sequenziert (Eurofins MWG Operon, Deutschland).

## IV. ERGEBNISSE

### 1 Multiplex-PCR

Zunächst wurden in der PCR nur einzelne Spezies (genomische DNA) als Target eingesetzt. Dabei war eine Amplifikation der einzelnen Erreger mit Nachweis auf dem Agarosegel möglich. Durch das Hinzufügen der DNA anderer Pathogene wurde die PCR hin zur Multiplex-PCR erweitert. Die DNA der verschiedenen Erregerspezies wurde dabei so kombiniert, wie das Vorhandensein der Pathogene in den verschiedenen Zeckenarten beschrieben ist (Tabelle A 9 im Anhang). Zum Beispiel war für *I. ricinus* eine theoretische Mehrfachinfektion mit den Erregern *Ap*, *Borrelia* spp. und *Rh* auf dem Agarosegel nachweisbar.

Durch die Optimierung des PCR-Protokolls war es sogar möglich, DNA der vier verschiedenen Genera von Pathogenen in einem Ansatz auf dem Agarosegel nachzuweisen (Abbildung 9). Dies stellt zwar nur eine theoretische Situation dar, da in einer einzelnen Zeckenspezies bisher nicht alle 4 verschiedenen Genera beschrieben wurden, zeigt aber das hohe Nachweispotential der Multiplex-PCR auf.



**Abbildung 9: 3 %iges Agarosegel mit Produkten aus der Multiplex-PCR**

Einsatz vier verschiedener Erreger in der Multiplex-PCR (genomische DNA)

Die Optimierung der Multiplex-PCR-Methode bewirkte eine Erhöhung der Spezifität, erkennbar durch die Reduktion der unspezifischen Banden auf dem Agarosegel, bei gleichbleibender Intensität der spezifischen Banden. Eine Annealingtemperatur von 58 °C ermöglichte die Amplifikation der jeweils eingesetzten DNA bei größtmöglicher Spezifität. Unterstützend wirkte dabei eine hohe KCl-Konzentration (2fache Konzentration des Puffers mit 100 mM KCl pro Reaktion), welche die Effizienz der Multiplex-Reaktion steigerte und die gleichzeitige Amplifikation mehrerer Loci ermöglichte (HENEGARIU et al., 1997).

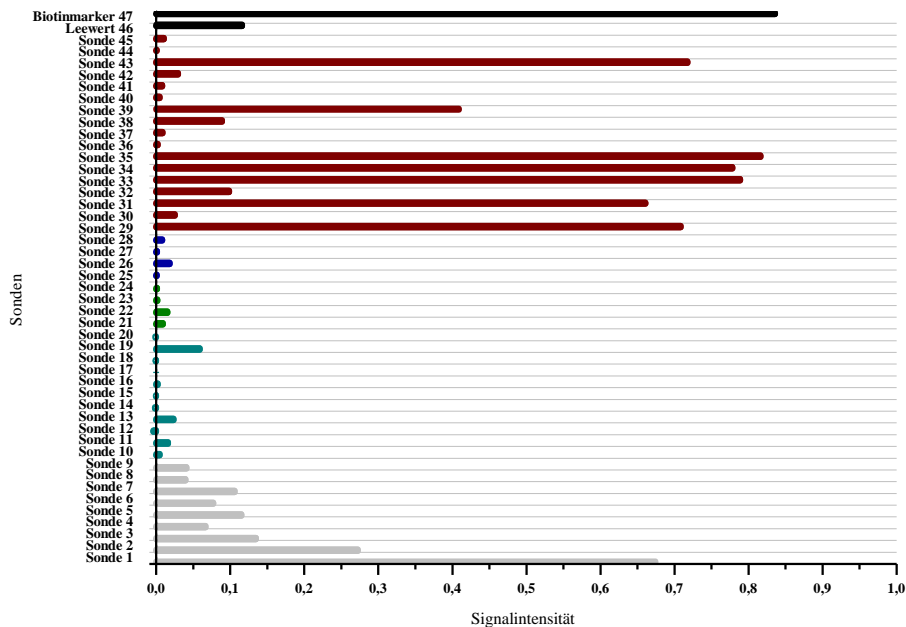
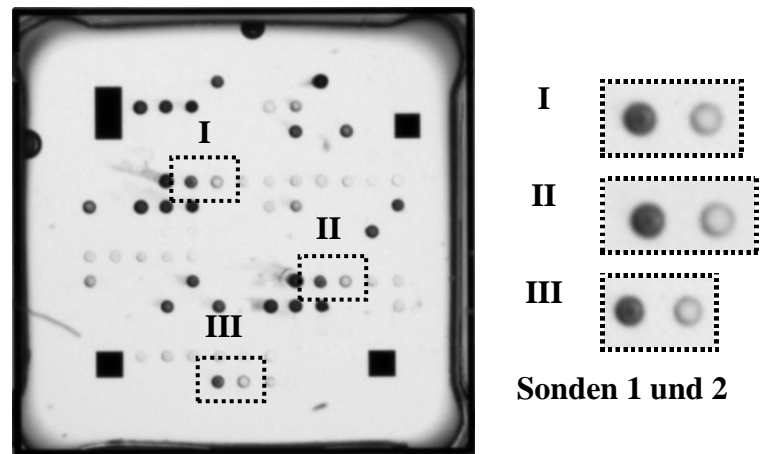
Bei allen Ansätzen zur Etablierung der Multiplex-PCR, zum Test auf Sensitivität und Spezifität und zur Beprobung der Zeckenproben waren die Negativkontrollen des Mastermixes und der DNA-Extraktion auf dem Agarosegel negativ.

## 2 Mikroarray-Analyse

Für die Hybridisierung auf dem Mikroarray wurde von der Firma Alere Technologies GmbH ein Standardprotokoll zur Verfügung gestellt. Um die Anzahl unspezifischer Signale auf dem Mikroarray zu verringern, wurden mehrere Parameter abgeändert und somit eine höhere Spezifität generiert. Die entscheidenden Veränderungen waren dabei, dass die PCR-Produkte vor der Hybridisierung denaturiert, die Hybridisierungstemperatur auf 57 °C erhöht und der erste Waschschrift nach der Hybridisierung auf 47 °C und 10 min verändert wurden. Durch die Veränderung dieser Parameter wurden deutlich spezifischere Signale auf dem Mikroarray erzeugt. Bei allen durchgeführten Experimenten lagen die Signalintensitäten der Biotinmarker (Positivkontrollen) bei 0,80 bis 0,87 und der Leerwerte (Negativkontrollen) bei -0,002 bis 0,13. Alle Analysen waren damit auswertbar.

Bei der Analyse der Positivkontrollen auf dem Mikroarray waren mit der Analyse nur einer Erregerspezies, für die jeweils genus-, aber auch speziesspezifischen Sonden ein deutlich positives Signal von > 0,6 messbar. Für alle Positivkontrollen war somit die spezifische Detektion bzw. Differenzierung mittels des entwickelten Mikroarrays möglich.

Bei der Analyse der Positivkontrollen für *Borrelia* spp. wurde allerdings, insbesondere bei *B. garinii* (*Bbav*) und *B. afzelii*, ein zusätzliches Signal der Sonden 1 und 2 (spezifisch für das Genus *Anaplasma/Ehrlichia*) gemessen. Außerdem gaben einzelne Sonden anderer *Borrelia*-Spezies ein Signal über dem Cut-off, z. B. die Sonde 39 (spezifisch für *B. afzelii*) bei der Analyse von *B. garinii* (*Bbav*) auf dem Mikroarray (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Mikroarray des PCR-Produkts von *B. garinii* (*Bbav*)**

mit speziesspezifischen Sondensignalen (Sonden 33-35) und zusätzlichen Signalen der Sonden 1 und 2 (Genus *Anaplasma*/*Ehrlichia*), 29 und 31 (*Bbss*), 39 (*B. afzelii*) und 43 (*Borrelia* spp.)

Da für die Auswertung des Mikroarrays und die Festlegung auf eine Spezies immer ein Muster mehrerer spezifischer Sondensignalen bewertet wurde, konnten diese einzelnen Sonden als nicht relevant angesehen werden.

Die spezifischen Signalmuster, die bei der Analyse der Positivkontrollen gemessen wurden und aus den Match-Tabellen ersichtlich waren, waren für *B. afzelii* die Sonden 39-42, für

*Bbss* die Sonden 29-32 und 36-38, für *B. garinii* (*Bbav*) die Sonden 33-35. Signale zusätzlicher Sonden konnten für den entwickelten Array je nach speziesspezifischer Sequenz auftreten und mussten über die Match-Tabellen ausgewertet werden.

Die spezifischen 16S rRNA-Sonden ergaben bei der Detektion der einzelnen Spezies von *Anaplasma* und *Ehrlichia* nicht immer eindeutige Signale. Bei der Analyse von *Ec* waren besonders für die Sonden 5-7 (eigentlich spezifisch für *Anaplasma* spp.) Werte oberhalb des Cut-offs messbar. Die Differenzierung von *Apl* und *Ap* war nur durch zusätzliche Informationen über die untersuchte Zeckenspezies gewährleistet, da die *Apl*-spezifische Sonde 6 Kreuzreaktionen bei der Analyse von *Ap* zeigte. Die Match-Tabellen ergaben hierbei 0 bis 6 Mismatches zu den Sequenzen von *Ap*. Von den Sonden, die für den Genusnachweis entwickelt wurden, zeigten die Sonden 1 und 2 deutliche Signale über dem Cut-off. Wie bereits beschrieben konnte das Signal insbesondere der Sonde 1 auch aufgrund einer Kreuzreaktion mit anderen Erregern wie *Borrelia* spp. zustande kommen. Ebenso zeigte sich im Laufe der Untersuchungen von Feldproben, dass bei den spezifisch für *Ec* entwickelten Sonden 4 und 8 Kreuzreaktionen mit Umweltkeimen oder Endosymbionten der analysierten Zecken auftraten.

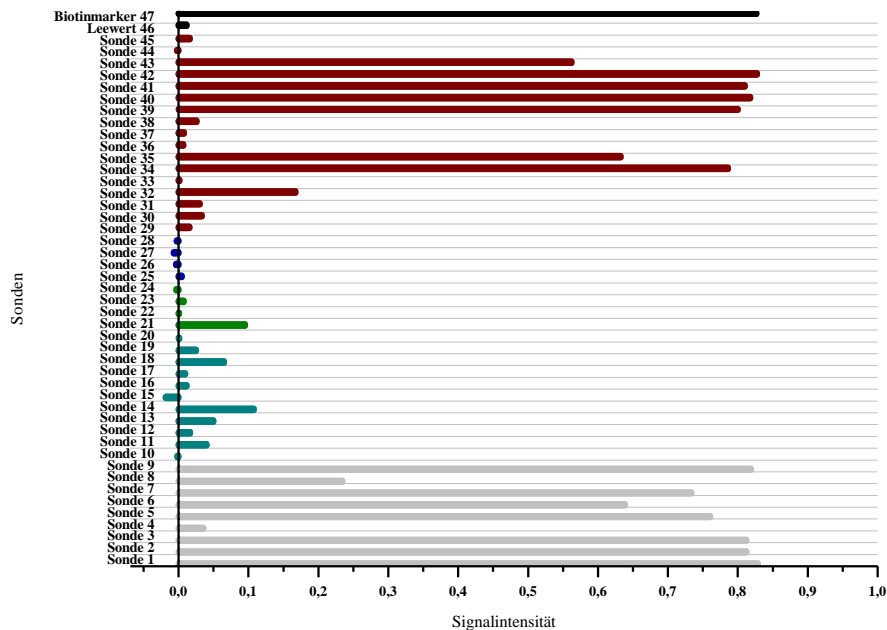
Die Sondenmuster, die die jeweilige Spezies differenzierten, waren für *Ap* die Sonden 1-3, 5, 7 und 9, für *Apl* 1-3, 5-7 und 9, sowie für *Ec* die Sonden 1, 2, 4 und 8.

Bei der Analyse der verschiedenen Babesien-Positivkontrollen wurde jeweils für die Sonde 20, eigentlich spezifisch für die Spezies *B. gibsoni*, ein positives Signal gemessen. Die Match-Tabelle ergab für diese Sonde nur einen Mismatch zu den Spezies *B. canis* und *B. vogeli*, wodurch die Kreuzreaktionen erklärt werden konnten. Unter Beachtung dieses zusätzlichen Signals war die Speziesdifferenzierung möglich. Die spezifischen Sonden signale, die mit den Positivkontrollen gemessen wurden, waren für *B. canis* die Sonden 10-12, 15, 16 und 19, für *B. vogeli* die Sonden 10-13, 15 und 17, für *B. gibsoni* die Sonden 10, 11, 14, 18 und 20.

Die Analyse der Rickettsien-Positivkontrollen mittels Mikroarray ergab hochspezifische Ergebnisse und eindeutige Sonden signale für die jeweiligen Spezies. Eine *Rh*- Infektion wurde durch die Sonden 21 und 22 (*ompB* Gen) und 25-28 (Detektion des *gltA* Gens des Genus *Rickettsia*) nachgewiesen. Die Signale der *gltA*-Sonden 25-28 wurden ebenfalls bei

einer *Rc*-Infektion gemessen, sowie zusätzlich die Signale der speziesspezifischen *ompB*-Sonden 23 und 24.

Die Analyse der biotinylierten Produkte aus den Duplex- und Multiplex-PCRs ergab, unter Beachtung der oben genannten Kriterien, sowohl bei Verwendung von Plasmid- als auch genomischer DNA, eindeutig auswertbare Ergebnisse. Als Beispiel für eine duplex PCR wurde genomische DNA von *Ap* und *B. afzelii* in der PCR eingesetzt. *B. afzelii* wurde dabei durch positive Signale der Sonden 39-42 detektiert, *Ap* durch die Sonden 1-3, 5, 7, 9. Zusätzlich wurden ein positive Signale der Sonden 34, 35 und 43 (*B. garinii* und *Borrelia* spp.) und der Sonde 6 (*Apl*) gemessen (Abbildung 11).



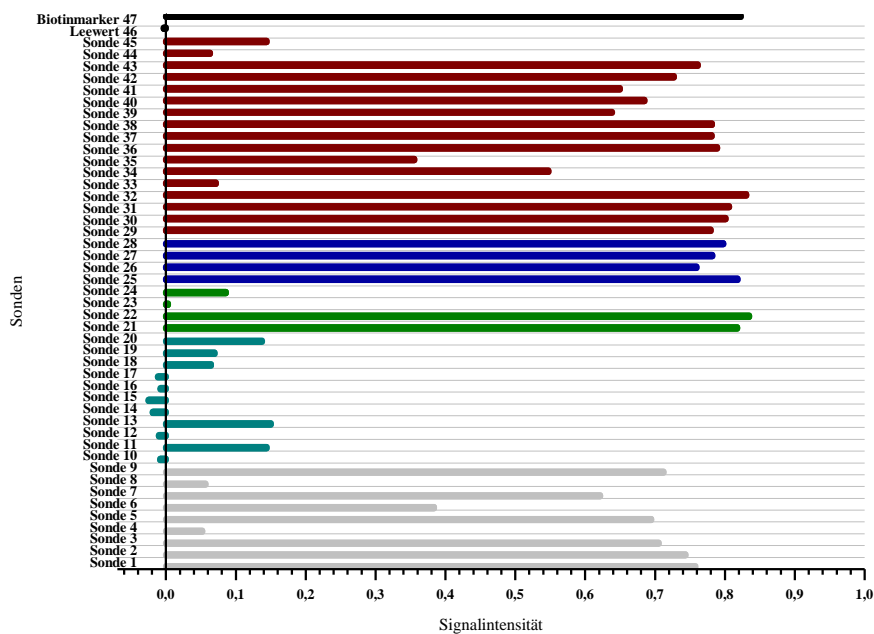
**Abbildung 11: Mikroarray des PCR-Produkts von *B. afzelii* und *Ap***

*Borrelia afzelii* (Sonden 39-42), *Anaplasma phagocytophilum* (Sonden 1-3, 5, 7 und 9), zusätzliche Signale der Sonden 34, 35 und 43 (*B. garinii* und *Borrelia* spp.) und der Sonde 6 (*Apl*), genomische DNA

Zur Imitation einer Mehrfachinfektion von *I. ricinus*, wurde die Plasmid-DNA von *B. afzelii*, *Bbss*, *Rh* und *Ap* in einer Multiplex-PCR eingesetzt und die PCR-Produkte auf dem Mikroarray analysiert (Abbildung 12). Auch in diesem Ansatz war ein Nachweis der einzelnen Erreger möglich. *B. afzelii* wurde durch die Sonden 39-42 detektiert. *Bbss* war



davon durch die Sonden 29-32 und 36-38 differenzierbar. Zusätzliche Signale wurden für die Sonden 34, 35 und 43 gemessen. Trotz der Signale der Sonden 34 und 35 wurde eine Infektion mit *B. garinii* (*Bbav*) unterschieden, da sich insbesondere die Sonde 33 als hochspezifisch für das Vorhandensein von *B. garinii* (*Bbav*) herausstellte. Die Match-Tabellen zeigten für diese Sonde jeweils 6 Mismatches zu den Sequenzen von *B. afzelii* und *Bbss* aus den Alignments. Die spezifischen Sonden für *Rh*, 21 und 22 für die Spezies und 25-28 für das Genus der Rickettsien, gaben deutliche Signale über dem Cut-off. Für *Ap* wurden positive Signale der Sonden 1-3, 5, 7, 9 und 6 (eigentlich spezifisch für *Apl*) gemessen.



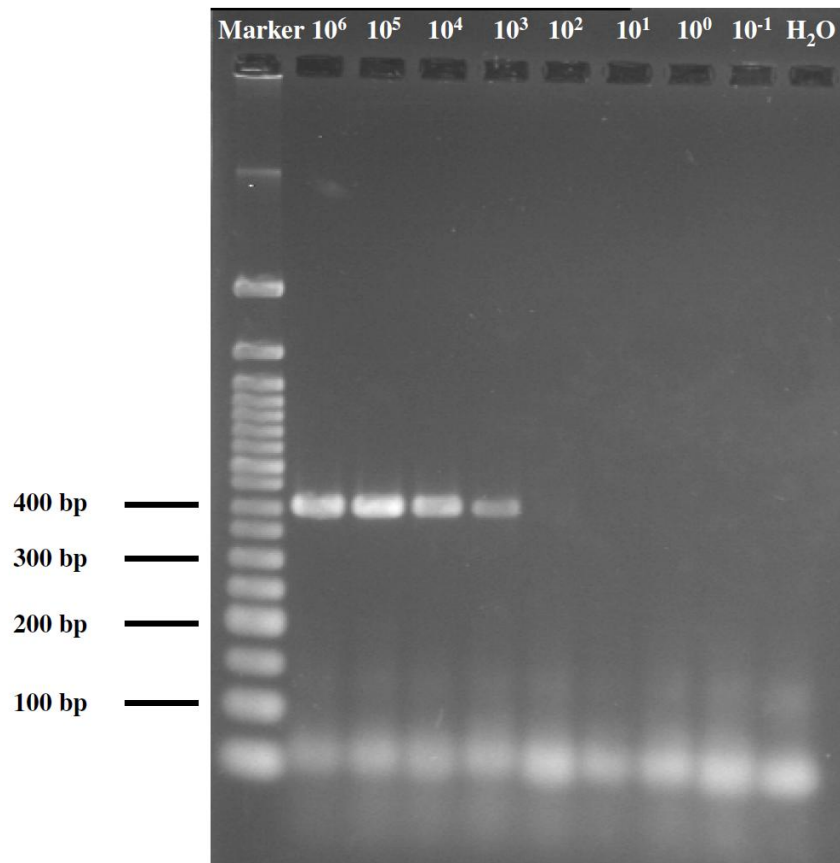
**Abbildung 12: Mikroarray des PCR-Produkts von *B. afzelii*, *Bbss*, *Rh* und *Ap***

*Borrelia afzelii* (Sonden 39-42), *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (Sonden 29-32 und 36-38), *Rickettsia helvetica* (Sonden 21, 22, 25-28), *Anaplasma phagocytophilum* (Sonden 1-3, 5, 7 und 9), zusätzliche Signale der Sonden 34, 35, 43 (*B. garinii* und *Borrelia* spp.) und der Sonde 6 (*Apl*)

### 3 Sensitivität und Festlegung des Cut-offs der Sonden

Verdünnungsreihen aller Positivkontrollen wurden in der Multiplex-PCR als Template eingesetzt, auf einem 3 %igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf dem

Mikroarray getestet. Als Beispiel ist hier die Sensitivitätsbestimmung für die Positivkontrolle von *Apl* dargestellt. Auf dem Gel sieht man mit höherer Verdünnungsstufe, d.h. entsprechend geringerer Anzahl an Gen-Kopien, eine schwächer werdende Bande des PCR-Produkts (Abbildung 13).

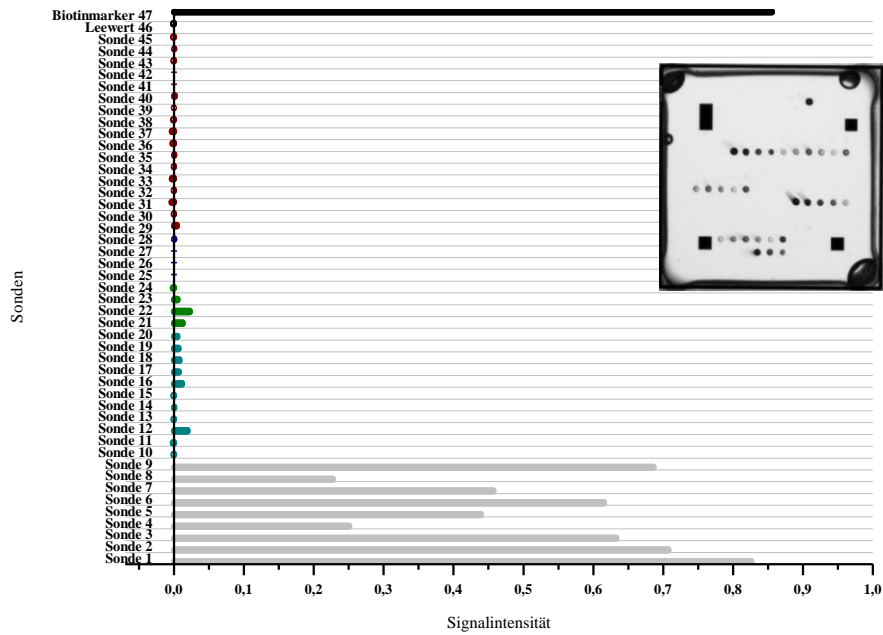


**Abbildung 13: Agarosegel der *Anaplasma-platys*-Verdünnungsreihe**

10<sup>6</sup> bis 10<sup>-1</sup> Gen-Kopien in der Multiplex-PCR, 3 %iges Agarosegel

Die PCR-Produkte der Verdünnungsstufen, die rechnerisch 10<sup>1</sup> bzw. 10<sup>0</sup> Gen-Kopien enthielten, wurden anschließend auf dem Mikroarray analysiert. Dabei verursachten die PCR-Produkte mit ursprünglich 10<sup>1</sup> Kopien in der Ausgangsmenge deutliche Signale auf dem Mikroarray (Abbildung 14 A), während für eine Verdünnungsstufe von 10<sup>0</sup> Gen-Kopien keine positiven Signale mehr gemessen werden konnten (Abbildung 14 B).

14 A



14 B

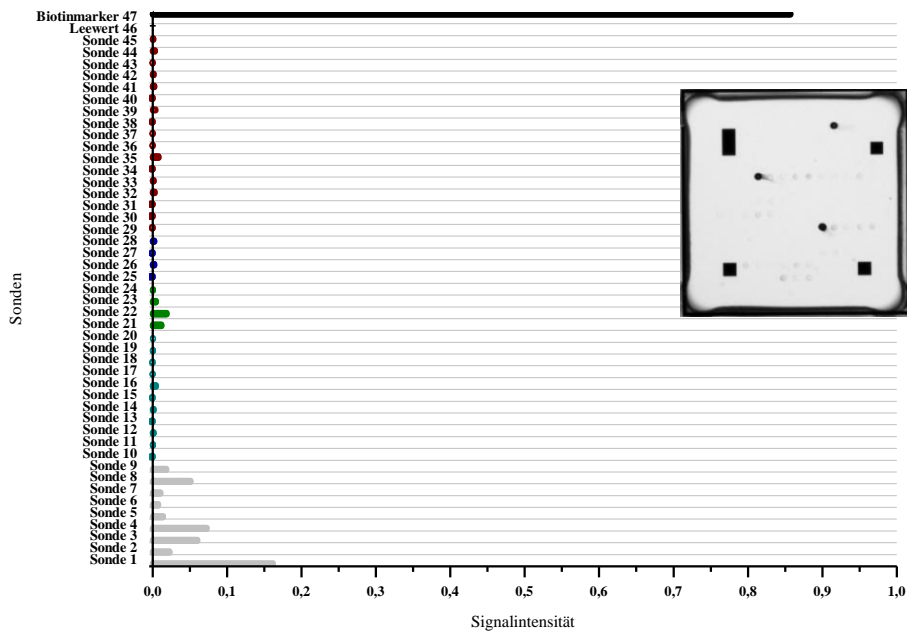


Abbildung 14: Mikroarrays der *Anaplasma-platys*-Verdünnungsreihe

14 A: PCR-Produkt aus  $10^1$  Kopien auf dem Mikroarray (Sonden 1-3, 5-7 und 9)

14 B: PCR-Produkt aus  $10^0$  Kopien auf dem Mikroarray

Für die Bestimmung der Sensitivität des Mikroarrays wurden die Verdünnungsstufen ausgewählt, für die auf dem Agarosegel gerade noch eine schwache Bande bzw. keine Bande mehr sichtbar war. Diese Vorgehensweise sollte die höhere Sensitivität des Mikroarrays verdeutlichen. Bis auf die Positivkontrolle von *B. canis* zeigte der Mikroarray im Vergleich zur Detektion mittels konventioneller Multiplex-PCR mit Nachweis auf dem Agarosegel eine bis zu 1000fach höhere Sensitivität für die einzelnen Positivkontrollen (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Vergleich der Sensitivität von Agarosegel und Mikroarray**

Analyse mit den hergestellten Positivkontrollen

SI: Signalintensität der Sonden

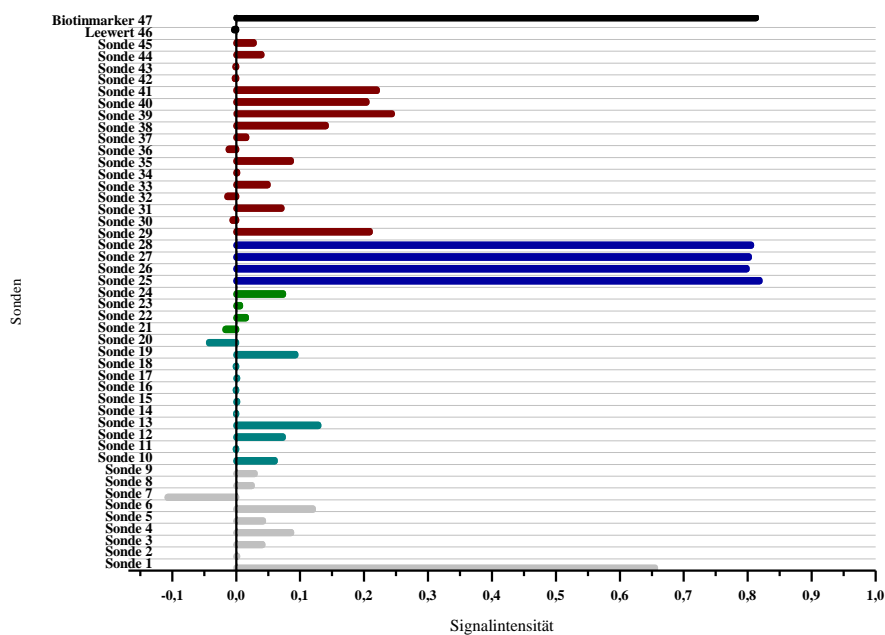
Target	Gen	Anzahl nachweisbarer Kopien	
		im Agarosegel	auf Mikroarray
<i>Ap</i>	16S rRNA	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup> (SI ≥ 0,16 – 0,50)
<i>Apl</i>	16S rRNA	10 <sup>3</sup>	10 <sup>1</sup> (SI ≥ 0,23 – 0,83)
<i>Ec</i>	16S rRNA	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup> (SI ≥ 0,24 – 0,83)
<i>B. canis</i>	18S rRNA	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> (SI ≥ 0,30 – 0,71)
<i>B. vogeli</i>	18S rRNA	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup> (SI ≥ 0,42 – 0,84)
<i>B. gibsoni</i>	18S rRNA	10 <sup>3</sup>	10 <sup>1</sup> (SI ≥ 0,18 – 0,53)
<i>B. afzelii</i>	<i>ospA</i>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup> (SI ≥ 0,16 – 0,86)
<i>B. garinii (Bbav)</i>	<i>ospA</i>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup> (SI ≥ 0,41 – 0,81)
<i>Bbss</i>	<i>ospA</i>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup> (SI ≥ 0,18 – 0,41)
<i>Rh</i>	<i>gltA + ompB</i>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>1</sup> (SI ≥ 0,83 – 0,87)
<i>Rc</i>	<i>gltA + ompB</i>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>1</sup> (SI ≥ 0,50 – 0,85)

Auf Grundlage der Sensitivitätsanalysen und weiterer Versuche, z. B. mit genomischer DNA, wurde ein empirischer Cut-off von 0,3 festgelegt. Signalintensitäten der Sonden  $\geq 0,3$  wurden für den DNA-Mikroarray als positiv angesehen. Bei Signalintensitäten zwischen 0,16 und 0,3 war keine eindeutige Aussage möglich und das Ergebnis wurde anhand des gesamten vorhandenen Musters an positiven Sonden beurteilt. Signalintensitäten  $< 0,16$  wurden als negativ gewertet.

## 4 Analyse der Spezifität

Alle 10 spezifisch *Borrelia*-spp.-freien *I. ricinus*-Proben waren auf dem Mikroarray negativ für *Borrelia* spp.

Die Untersuchung anderer Erregerspezies, zum Test auf die Spezifität des Mikroarrays, ergab für die Rickettsien jeweils positive Signale der Sonden, die das Genus *Rickettsia* nachweisen. Die Signalintensitäten lagen bei den Proben von *R. honei* und *R. monacensis* dabei um 0,8. Die für *Rh* und *Rc* spezifischen *ompB*-Sonden waren negativ (Abbildungen 15 und 16). Die Detektion von *Rickettsia* spp. mit den *gltA*-Sonden und die Differenzierung von *Rh* und *Rc* war daher mit dem entwickelten Mikroarray möglich. Bei der Analyse der beiden Rickettsienspezies zeigte allerdings die für das Genus *Anaplasma/Ehrlichia* spezifische Sonde 1 ein deutlich positives Signal von etwa 0,65.



**Abbildung 15: Mikroarray der PCR-Produkte von *Rickettsia honei***

Sonden 25-28 (Genus *Rickettsia*), Sonde 1 (Genus *Anaplasma/Ehrlichia*)

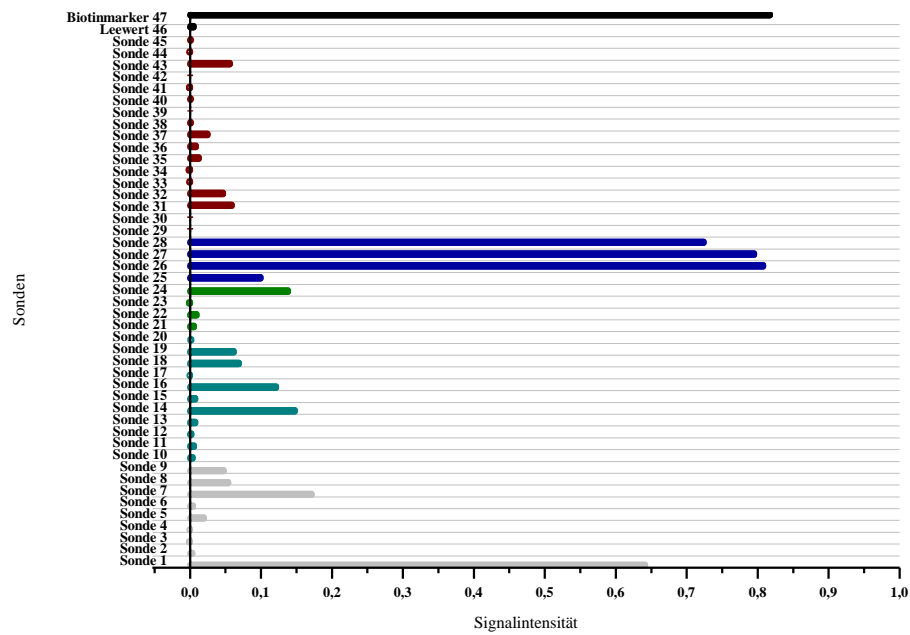
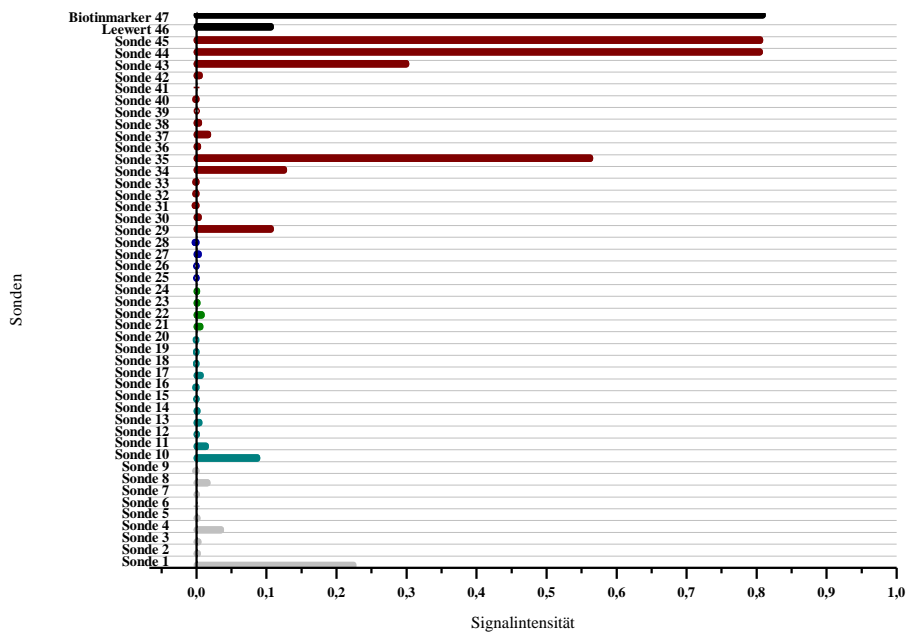


Abbildung 16: Mikroarray der PCR-Produkte von *Rickettsia monacensis*

Sonden 26-28 (Genus *Rickettsia*), Sonde 1 (Genus *Anaplasma/Ehrlichia*)

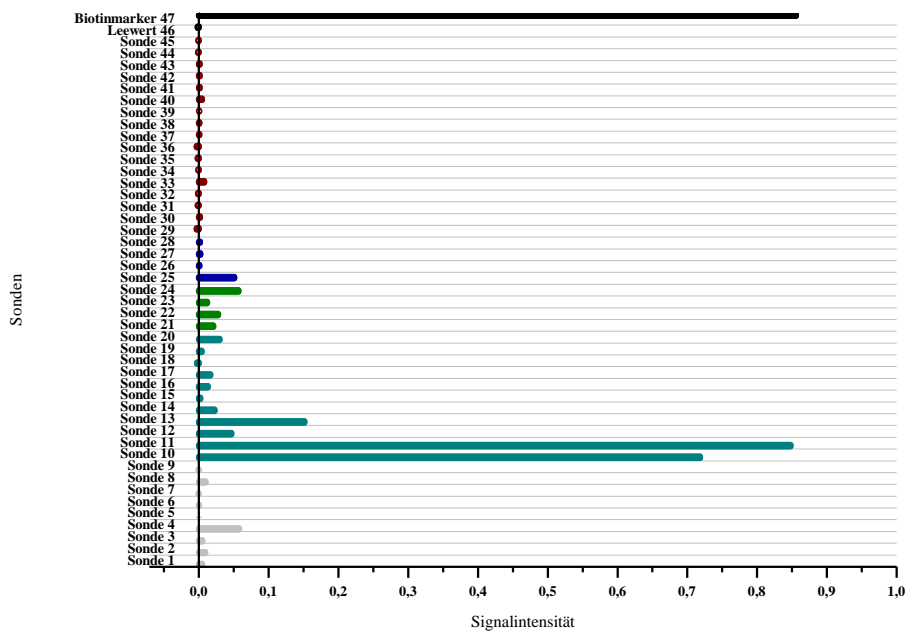
Bei der Analyse von *Borrelia spielmanii* (Abbildung 17) konnten für die Sonden 44 und 45, die spezifisch diese Spezies differenzieren sollen, jeweils positive Signale mit einer Intensität von etwa 0,8 gemessen werden. Die zusätzlichen Signale der Sonden 35 (Signalintensität 0,55) und 43 (Signalintensität 0,3) wurden *Borrelia* spp. zugeordnet. Das Signal der Sonde 1 mit einem Wert von etwa 0,2 wurde, wie bereits beschrieben, durch Kreuzreaktionen der Borrelien mit der Sonde verursacht und konnte daher als negativ gewertet werden. Mit dem entwickelten Mikroarray war folglich auch die Detektion und Differenzierung von *B. spielmanii* möglich.



**Abbildung 17: Mikroarray der PCR-Produkte von *Borrelia spielmanii***

Sonden 44 und 45 (*Borrelia spielmanii*), 35 und 43 (*Borrelia* spp.)

Bei der Prüfung der PCR-Produkte des Plasmids von *Babesia microti*-like wurden deutlich positive Signale der genusspezifischen 18S rRNA-Sonden gemessen (Signalintensitäten 0,7 bis 0,85). Alle für *B. canis*, *vogeli* und *gibsoni* spezifischen Sonden blieben dagegen negativ. Das Design der 18S rRNA-Sonden des Mikroarrays erlaubte damit den Nachweis des Genus *Babesia* und die spezifische Differenzierung zu den ausgewählten Spezies (Abbildung 18).

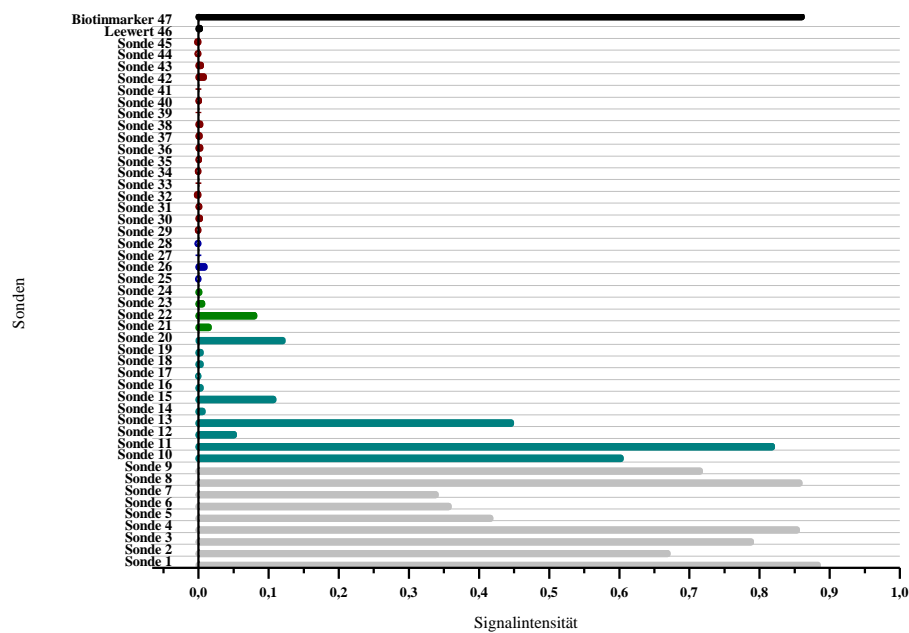


**Abbildung 18: Mikroarray der PCR-Produkte von *Babesia microti*-like**

Sonden 10 und 11 (Genus *Babesia*)



Für *Anaplasma marginale* wurden für die genusspezifischen Sonden 1 bis 3 Signalintensitäten oberhalb des Cut-offs ( $> 0,65$ ) und zusätzliche Signale anderer 16S rRNA-Sonden gemessen. Ebenso waren die für Babesien spezifischen Sonden 10, 11 und 13 mit Werten  $> 0,4$  deutlich positiv (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Mikroarray der PCR-Produkte von *Anaplasma marginale***

Sonden 1-3 (Genus *Anaplasma*/*Ehrlichia*) und zusätzliche Signale der Sonden 4-9 (*Anaplasma* spp./*Ehrlichia* spp.), 10, 11 und 13 (Genus *Babesia*, *Babesia vogeli*)

## 5 Ergebnisse der Analysen der Feldproben

### 5.1 Ergebnisse der *Ixodes-ricinus*-Feldproben

Bei 29,3 % (n = 44) der *I. ricinus*-Zecken waren Signale für *Rickettsia* spp. messbar. Davon waren 72,7 % (n = 32) positiv für *Rh* (*ompB*-Sonden 21, 22 und *gltA*-Sonden 25-28, oder einzelne Signale der *ompB*-Sonden 21, 22). Sechs Proben zeigten positive Signale für *Borrelia* spp. Die Ergebnisse der Speziesdifferenzierung wurden durch die *ospA* real-time PCR bestätigt (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Vergleich DNA-Mikroarray zu *ospA* real-time PCR**

*Borrelia*-spp.-positive *I. ricinus*-Zecken

SI: Sondenintensität

P: Positivkontrolle

negativ: C<sub>t</sub>-Werte über 40

<sup>a</sup>keine eindeutige Aussage möglich

Zecke Nr.	Mikroarray Speziesnachweis	SI	real-time PCR (C <sub>t</sub> -Werte)		
			<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>	<i>Bbss</i>
22	<i>Bbss</i>	> 0,25	negativ	negativ	37,59
32	<i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i>	> 0,32	36,42	37,67	negativ
96	<i>Bbss</i>	> 0,25	negativ	negativ	37,52
113	<i>B. afzelii</i>	> 0,23	35,46	38,91	negativ
149	<i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i> , <i>Bbss</i> <sup>a</sup>	> 0,64	34,97	35,71	39,99 <sup>a</sup>
150	<i>Bbss</i>	> 0,25	negativ	negativ	36,42
			P: 27,91	P: 32,87	P: 28,65

In einer *I. ricinus*-Probe (0,7 %) konnte eine Doppelinfektion mit *Ap* und *Rh* detektiert werden (Tabelle 9). Die *Ap*-spezifischen Sonden zeigten dabei Werte > 0,64. Das Ergebnis für *Ap* wurde durch die *msp2* real-time PCR bestätigt (durchschnittlicher C<sub>t</sub>-Wert der Probe 31,42). Eine weitere Doppelinfektion konnte mit den Erregern *Rh* und *Bbss* in *I. ricinus* detektiert werden. Eine Infektion mit den 3 Pathogenen *B. afzelii*, *B. garinii* (*Bbav*) und *Rh* konnte in einer Probe mittels Mikroarray nachgewiesen werden. Eine weitere Dreifachinfektion mit den Pathogenen *B. afzelii*, *B. garinii* (*Bbav*) und *Rickettsia* spp. wurde mit zusätzlicher *ospA* real-time PCR detektiert. Die Infektion einer Zecke mit *B. afzelii*, *B. garinii* (*Bbav*) und *Bbss* konnte durch Mikroarray-Analyse und real-time PCR nicht eindeutig bestätigt werden.

**Tabelle 9: Koinfektionen in *I. ricinus* detektiert mittels Mikroarray**<sup>a</sup>zusätzlich durch real-time PCR detektiert<sup>b</sup>Dreifachinfektion zweifelhaft<sup>c</sup>keine eindeutige Aussage möglich

Anzahl Erreger	Koinfektionen <i>I. ricinus</i>		
2	<i>Rh</i>	<i>Bbss</i>	
2	<i>Rh</i>	<i>Ap</i>	
3	<i>Rh</i>	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii (Bbav)</i>
3	<i>Rickettsia</i> spp.	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii (Bbav)</i> <sup>a</sup>
3 <sup>b</sup>	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii (Bbav)</i>	<i>Bbss</i> <sup>c</sup>

Insgesamt zeigten 108 (72,0 %) der *I.-ricinus*-Proben positive Signale für die eigentlich *Ec* spezifischen Sonden 1, 4 und 8.

## 5.2 Ergebnisse der *Dermacentor-reticulatus*-Feldproben

Bei 66,9 % (n = 117) der *D.-reticulatus*-Zecken konnte ein Signal für *Rickettsia* spp. gemessen werden (*gltA*- und/oder *ompB*-Sonden). Interessanterweise zeigten drei Proben spezifisch positive SONDENSIGNALE für *Rh* (*ompB*-Sonden 21 und 22 und *gltA*-Sonden).

Es konnten keine *Babesia* spp. spezifischen SONDENSIGNALE über dem Cut-off detektiert werden.

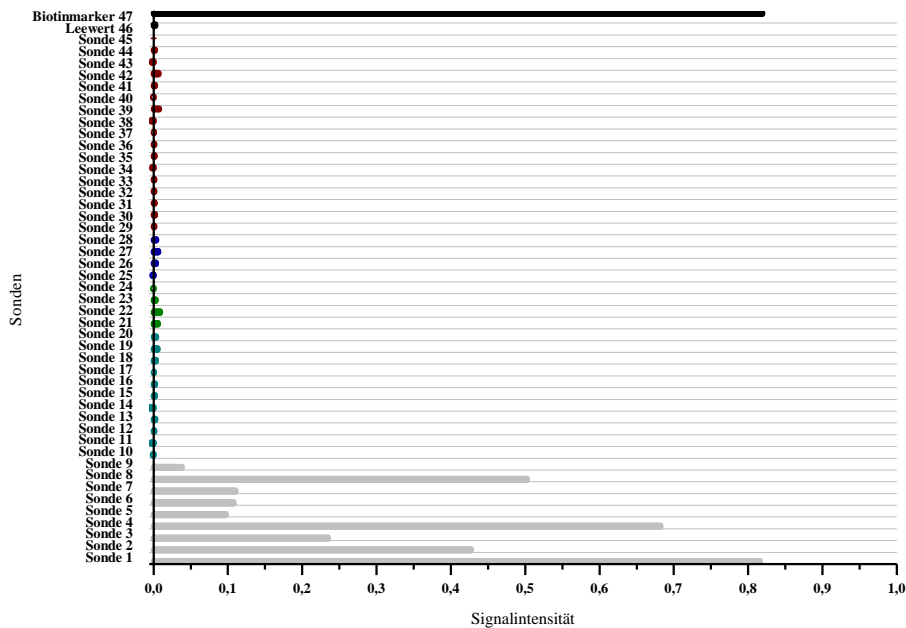
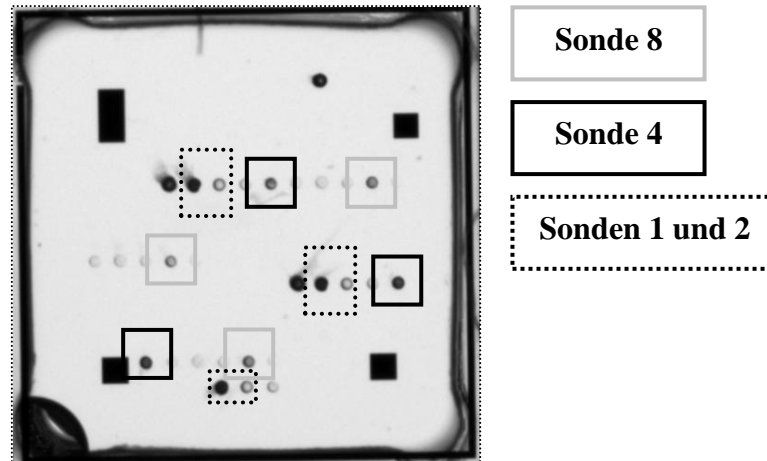
In 142 (81,1 %) *D.-reticulatus*-Zecken waren die Sonden 1, 4 und 8 (spezifisch für *Ec*) positiv.

## 6 Analyse unspezifischer Signale in den Feldproben

Bei 70,3 % der *D.-reticulatus*- und 64,7 % der *I.-ricinus*-Zecken war nach der Amplifikation durch die Multiplex-PCR eine zusätzliche, etwa 400 bp große Bande auf dem Agarosegel sichtbar. Um diese Bande weiter zu spezifizieren, wurde bei vier Proben von *D. reticulatus* eine *mSP2* real-time PCR durchgeführt. In dieser hochspezifischen PCR waren alle vier Proben negativ.

Bei der Analyse der Feldproben auf dem Mikroarray waren bei 81,1 % der *D.-reticulatus*- und bei 72,0 % der *I.-ricinus*-Zecken positive Signale der Sonden 1, 4 und 8 messbar (Abbildung 20). Sonde 1 wurde entwickelt um spezifisch das Genus *Anaplasma/Ehrlichia* nachweisen zu können, während die Sonden 4 und 8 die Spezies *Ec* differenzieren. Das starke Signal der Sonden wies damit theoretisch auf das Vorhandensein von *Ec* in der Probe hin. Da allerdings als hauptsächlicher Vektor für *Ec* die Zecke *R. sanguineus*

beschrieben ist und die Übertragung durch *Dermacentor* nur für die Spezies *D. variabilis* bekannt ist (JOHNSON et al., 1998; MURPHY et al., 1998), wurde die unspezifische, etwa 400 bp große Bande weiter aufgearbeitet, um Fehlhybridisierungen der Sonden zu untersuchen.



**Abbildung 20: Mikroarray einer Probe von *D. reticulatus***

mit unspezifischer, 400 bp großer Bande im Agarosegel  
Sonden 1, 2 (Genus *Anaplasma*/*Ehrlichia*), 4 und 8 (*Ehrlichia canis*)

Die Sequenzierungen der PCR-Produkte sowohl aus der Multiplex-PCR als auch aus der zusätzlich durchgeführten PCR der 16S rRNA, lieferten keine eindeutigen Ergebnisse. Die

Elektropherogramme beider Sequenzierungen zeigten über große Abschnitte hinweg Doppel- und Mehrfachpeaks.

Nach Klonierung und Sequenzierung der unspezifischen Bande einer Probe von *D. reticulatus* ergab die BLAST-Analyse eine 100 %ige Übereinstimmung mit der 16S rRNA von Umweltkeimen (Bacterium WM06i\_A10G/Accession no. HM989886, *Methylobacterium* sp. ED325/Accession no. GQ342537, uncultured bacterium/Accession nos. HM313735, AM697235). Die Sonden, die ein deutliches Signal auf dem Mikroarray zeigten, wiesen 1-5 Mismatches zu der nicht erwarteten Sequenz auf (Abbildung A 2 im Anhang).

Von der unspezifischen Bande von *I. ricinus* konnten insgesamt vier Klone sequenziert werden. Drei davon stimmten auf der gesamten Länge der Sequenz (402 bp) überein. Die vierte Sequenz hatte an der 370. Stelle einen Nuklotidaustausch von Adenin zu Guanin, was aber in der Aminosäuresequenz keine Veränderung verursachte. In den BLAST-Analysen zeigte die unspezifische Sequenz eine 100 %ige Übereinstimmung mit *Candidatus* Midichloria mitochondrii (IricVA, complete genome/Accession no. CP002130 bzw. partial 16S rRNA gene/Accession no. AJ566640) und mit *Rickettsiales* bacterium It62 (16S rRNA gene, partial sequence/Accession no. AF525481). Die positiven Sonden auf dem Mikroarray wiesen 0-4 Mismatches zu diesen Sequenzen auf (Abbildung A 3 im Anhang).

## V. DISKUSSION

### 1 Ergebnisse der Untersuchung von Feldproben

Um den entwickelten Mikroarray mit vorgeschalteter Multiplex-PCR auf Funktionalität zu prüfen wurden mit dem Assay Feldproben untersucht. In den gesammelten Zecken wurde mit dem Mikroarray keine Babesien-spezifische DNA nachgewiesen. Lediglich eine *D. reticulatus*-Probe zeigte Hinweise auf eine Infektion mit *Babesia* spp., allerdings blieben die Werte der Sonden unter dem Cut-off. Zukünftig ist zu erwarten, dass weitere Spezies der Babesien in epidemiologischen Analysen und klinischer Diagnostik eine wichtige Rolle spielen werden, da sich verschiedene Babesienspezies durch Reiseaktivitäten, Import von Hunden und andere Tierbewegungen, in nicht endemische Gebiete ausbreiten können und damit ein Risiko für Menschen und Tiere darstellen (HAMEL et al., 2011; OTRANTO et al., 2010). Zunehmend wichtige Spezies sind insbesondere *Babesia* sp. EU1 (*B. venatorum*), *B. divergens*, *B. microti* und *B. microti*-like (*Theileria annae*) (CAMACHO et al., 2004; HILDEBRANDT et al., 2011a; SCHORN et al., 2011).

Mittels Mikroarray konnten in sechs der *I. ricinus*-Proben eine Infektion mit *Borrelia* spp. nachgewiesen werden. In Abhängigkeit der initial vorhandenen DNA-Konzentration in der Probe stimmten die Ergebnisse von Mikroarray und *ospA* real-time PCR überein. Alle untersuchten *I. ricinus*-Zecken wurden in einer zusätzlichen Studie am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim, in der Kultur und einer *p41* PCR getestet, welche ein Flagellinprotein der Borrelien detektierte. Sequenzierungen der Produkte der *p41* PCR waren für die vorliegende Arbeit nicht verfügbar. Alle *I. ricinus*-Proben, die in der Kultur positiv wurden, wurden auch auf dem Mikroarray positiv. In der *p41* PCR waren 15 der insgesamt 150 *I. ricinus*-Zecken positiv für *Borrelia* spp. Von diesen 15 zeigten allerdings nur vier Proben positive Sondensignale für *Borrelia* spp. auf dem Mikroarray. Andererseits konnten mittels Mikroarray zusätzlich zwei *Borrelia*-spp.-positive Proben bestimmt werden, die in der *p41* PCR negativ waren. Die Proben, welche positiv in der *p41* PCR waren, aber negativ auf dem Mikroarray, können einerseits durch das Vorhandensein von z. B. *Borrelia miyamotoi* sensu lato in den Proben erklärt werden. Diese Rückfallfieber-Borrelien werden in PCRs mit dem Nachweis des Flagellinproteins erfasst (WODECKA et al., 2010). Andererseits sollte, in Anbetracht der unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Nachweismethoden und der beschriebenen Prävalenzen von *Borrelia* spp. in Zecken (HILDEBRANDT et al., 2011a),

das entwickelte Sonden-Set des Mikroarrays für *Borrelia* spp. erweitert werden. Dabei ist die Verwendung zusätzlicher Gene für den spezifischen Genus-Nachweis, die Erhöhung der Sensitivität und eine klare Differenzierung einzelner Spezies für die Optimierung des Nachweisverfahrens sinnvoll.

Die geringe Infektionsrate von *I. ricinus* mit *Ap* stimmt mit früheren Beschreibungen über die gebietsweise *Ap*-Prävalenz in *I. ricinus* überein (HARTELT et al., 2004; SEVERINSSON et al., 2010). Dennoch ist eine Optimierung des SONDENSETS zur Steigerung der Sensitivität und Spezifität sinnvoll. Auffällig bei der Untersuchung der Feldproben war das häufige Auftreten positiver Werte der Sonden 1, 4 und 8. Das lässt darauf schließen, dass die 16S rRNA in dem verwendeten Genabschnitt zu hoch konserviert ist, um eine Differenzierung zu anderen, in der Probe vorhandenen Erregern oder möglichen Endosymbionten zu gewährleisten.

Für die *I.-ricinus*-Proben wurden vergleichbar hohe Infektionsraten mit *Rickettsia* spp. und *Rh* nachgewiesen, wie in früheren Studien gebietsweise für Deutschland beschrieben (SILAGHI et al., 2008; SILAGHI et al., 2011). Die hohe Infektionsrate von *D. reticulatus* stimmte für *Rickettsia* spp. mit 66,9 % mit der Literatur überein (SILAGHI et al., 2011). Bei der Untersuchung von *D.-reticulatus*-Feldproben konnten einzelne positive Signale für die Sonde 24 (*ompB*, spezifisch für *Rc*) zusätzlich zu den *gltA*-Sonden gemessen werden. Die Auswertung der Match-Tabellen für die Sonden des *ompB*-Gens ergab 0 bis 3 mögliche Mismatches zu *Rickettsia* spp. Für eine Erweiterung des Mikroarray-Designs sollten zusätzliche Rickettsienarten für die Detektion einbezogen werden wie z. B. *R. slovacica*, *R. monacensis*, *R. sibirica*, *R. massiliae* und *R. sp. RpA4 (R. raoultii)* (DAUTEL et al., 2006; DOBLER et al., 2009; RIEG et al., 2011), welche durch die Anpassung des spezifischen SONDENSETS deutlich von *Rh* und *Rc* differenzierbar sein sollten.

Mit Mikroarray-Analysen besteht aufgrund der hohen Sensitivität zudem die Möglichkeit epidemiologische Studien durchzuführen. Interessante Schwerpunkte wären hierbei das Expositionsrisiko in nicht endemischen Gebieten und der Nachweis noch unbekannter Rickettsienspezies, messbar über einzelne genus- oder speziesspezifische positive Sonden. Einzelne speziesspezifische Signale für *Rh* oder *Rc* in den untersuchten *D.-reticulatus*-Proben könnten von solchen Fehlhybridisierungen zu *Rickettsia* spp. herkommen. Andererseits besteht auch ein Hinweis darauf, dass diese Zeckenspezies auch mit *Rh* infiziert sein kann (DOBEC et al., 2009). Für mögliche Studien auf Grundlage des

entwickelten Mikroarrays ist von Vorteil, dass jedes Probenmaterial (Blut, Gewebe, Tupfer) eingesetzt werden kann, aus dem pathogene DNA extrahierbar ist.

Die Analysen der Feldproben mittels Multiplex-PCR und Mikroarray zeigten, dass das entwickelte Verfahren zum Nachweis multipler Pathogene eingesetzt werden kann. Die Ergebnisse waren dabei vergleichbar mit real-time PCRs zur Detektion von *ospA* und *msp2*, welche zur Bestätigung der Analysen eingesetzt wurden. Eine weitere Optimierung der entwickelten Sonden ermöglicht, auch für den gleichzeitigen Nachweis multipler Pathogene, eine Steigerung von Sensitivität und Spezifität.

## 2 Analyse unspezifischer Signale in den Feldproben

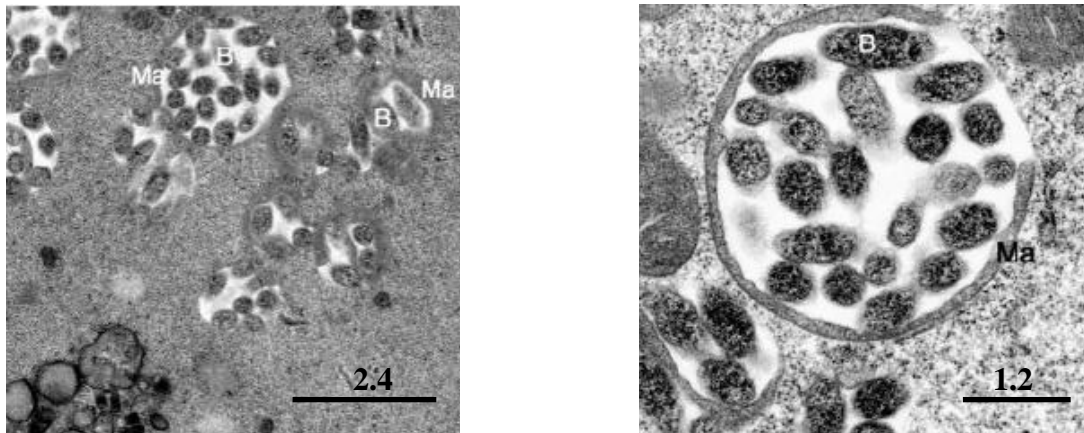
Zur Charakterisierung unspezifischer Signale in den untersuchten Feldproben wurden einerseits klonierte, andererseits aufgereinigte PCR-Produkte sequenziert. Die Sequenzierungen der aufgereinigten Produkte aus der PCR der 16S rRNA und der Multiplex-PCR ergaben keine eindeutigen Ergebnisse. Die Elektropherogramme zeigten selbst in den kurzen Abschnitten, die auswertbar waren, vereinzelt Doppel- und Mehrfachpeaks. Gerade bei Genen, die so hoch konserviert sind wie die 16S rRNA, ist eine korrekte Sequenz wichtig, um bei BLAST-Analysen spezifische Aussagen hinsichtlich Genus und Spezies treffen zu können, da, abhängig von der Datenbank und der Analysemethode, schon Sequenzunterschiede von 0,5-1 % für die Spezies- und 1-5 % für die Genusdifferenzierung definiert werden (CLARRIDGE, 2004). Die Ergebnisse der Elektropherogramme lassen darauf schließen, dass mehr als ein PCR-Produkt sequenziert wurde und damit mehrere Erreger in der ursprünglichen Probe vorhanden gewesen sein müssen.

Der Sequenzabschnitt der 16S rRNA, der für das Design der Multiplex-PCR und des DNA-Mikroarrays gewählt wurde, scheint in diesem Bereich zu hoch konserviert zu sein, um die ausgewählten Erreger aus der Familie der Anaplasmataceae von anderen Erregern oder Endosymbionten differenzieren zu können. Bei den DNA-Proben von *D. reticulatus* gaben die eigentlich für *Ec* spezifischen Sonden deutliche Signale, und das obwohl eine Infektion dieser Zeckart mit *Ec* bei einer so hohen Infektionsrate ausgeschlossen werden kann (JOHNSON et al., 1998; MURPHY et al., 1998). Die Sequenz der unspezifischen Bande aus *D. reticulatus* ließ sich mit der von Umweltkeimen abgleichen. Diese haften vermutlich an den Zecken und hybridisierten aufgrund der hohen Konservierung des 16S rRNA-Abschnitts mit den beschriebenen Sonden. Der detektierte Umweltkeim



*Methylobacterium* sp. wurde bereits in *I. ricinus*-Zecken beschrieben (CARPI et al., 2011). Andere Umweltkeime, die bereits in *D. reticulatus* nachgewiesen werden konnten, waren vor allem *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Staphylococcus* sp. und *Pseudomonas* sp. (RUDOLF et al., 2009). Eine Analyse der 16S rRNA-Sequenzen des *Francisella*-like Endosymbionten, der in Portugal in bis zu 39 % der *D.-reticulatus*-Zecken nachgewiesen wurde (DE CARVALHO et al., 2011), ergab dass die entwickelten 16S rRNA-Primer mit dem 3'-Ende an die 16S rRNA der Endosymbionten binden könnten (Accession nos. HQ705173 und EU2345353). Die *Ec*-spezifischen Sonden zeigten nur 0-3 Mismatches mit den überprüften Sequenzen des Endosymbionten, wodurch Kreuzhybridisierungen nicht auszuschließen sind. Bei einer Optimierung des Mikroarrays sollten deswegen die genannten Erreger in die Alignments aufgenommen werden, damit eine spezifische Differenzierung der Erreger und verschiedener Spezies möglich ist.

Die Sequenz der unspezifischen Bande aus der Multiplex-PCR von *I. ricinus* zeigte hingegen eine 100 %ige Übereinstimmung zu dem Erreger *Candidatus* (*Cand.*) *Midichloria mitochondrii*, dessen Vorkommen in *I. ricinus* bereits beschrieben wurde (SASSERA et al., 2006). Dieser zunächst als „IricES1“ benannte Endosymbiont wurde durch Elektronenmikroskopie, *in situ* Hybridisierung und Sequenzierung der 16S rRNA charakterisiert (BENINATI et al., 2004). Die Prävalenzraten betragen einer Studie der gleichen Arbeitsgruppe zufolge 100 % für weibliche und 44 % für männliche Zecken (LO et al., 2006). Aufgrund weiterer Untersuchungen der Phylogenie des *gyrB*-Gens wurde der Erreger den Rickettsiales zugeordnet und in *Cand. Midichloria mitochondrii* umbenannt (SASSERA et al., 2006). Der Erreger ist im Elektronenmikroskop in verschiedenen Zelltypen der Zeckenovarien sichtbar und vermehrt sich dort innerhalb der Mitochondrien (Abbildung 21). Nach einer Blutmahlzeit der Zecke kommt es zur Vermehrung der Bakterien, messbar über den Anstieg der Kopienanzahl des *gyrB*-Gens (SASSERA et al., 2008). Selbst bei Beschädigung der Mitochondrienmembranen durch die Endosymbionten, scheint die Vermehrung im periplasmatischen Raum der Organellen bzw. das eigentliche Vorhandensein der Bakterien keinen negativen Einfluss auf die Entwicklung der Zeckeneier zu haben (SACCHI et al., 2004; SASSERA et al., 2006; SASSERA et al., 2008). Zusätzlich ist vermutlich die vertikale Übertragung des Endosymbionten möglich (SACCHI et al., 2004).



**Abbildung 21: Elektronenmikroskopie von *Cand. Midichloria mitochondrii***

Mitochondrien der Ovarienzellen von *Ixodes ricinus* (SASSERA et al., 2006)

B: *Cand. Midichloria mitochondrii*

MA: Matrix der Mitochondrien

Die beschriebenen Prävalenzdaten weisen auf ein ubiquitäres Vorkommen des Endosymbionten in den weiblichen Zecken von *I. ricinus* hin und werfen die Frage auf, ob der Erreger direkte Auswirkungen auf die Zecke oder auch auf die Pathogene hat, die durch die Zecke übertragen werden (SASSERA et al., 2006). Inwieweit die Bakterien einen Einfluss haben ist allerdings noch ungeklärt.

Hinsichtlich weiterer Endosymbionten sollten bei einer Optimierung des Mikroarraydesigns für *I. ricinus* auch *Wolbachia* sp. und *Rickettsiella* sp. bei der Auswahl des Zielgens und dem Primer- und Sondendesign berücksichtigt werden. Bei Sequenzanalysen zeigte sich, dass die in der vorliegenden Arbeit entwickelten 16S rRNA-Primer am 3'-Ende mit der 16S rRNA-Sequenz von *Wolbachia pipientis* (Accession no. GU724968) hybridisieren könnten und dadurch ein etwa 400 bp großes Fragment amplifizieren würden. Zu den entwickelten Sonden 1, 4 und 8 ergäbe dieses Fragment von *Wolbachia* 0 bis 6 Mismatches, weswegen Kreuzhybridisierungen auftreten könnten.

Das Vorhandensein einer großen Anzahl an verschiedenen Erregern in den Zecken kann neben Kreuzreaktionen auf dem Mikroarray auch Auswirkungen auf den Nachweis der ausgewählten Pathogene in der Multiplex-PCR zur Folge haben. Durch Konkurrenz in der PCR-Reaktion ist es möglich, dass die Amplifikation der DNA von Pathogenen, die eigentlich nachgewiesen werden sollten, gehemmt wird und dadurch ein schwaches oder negatives Signal auf dem Mikroarray resultiert. Für weitere Studien mit Zecken als Probenmaterial sollten z. B. Genabschnitte für das Array-Design verwendet werden, die

hochspezifisch für die jeweiligen Spezies sind und keine Amplifikation anderer Erreger erlauben.

### 3 Multiplex-PCR

Die Effizienz der Multiplex-PCR hat einen entscheidenden Einfluss auf die Analyse einer Probe mittels DNA-Mikroarray. Wird eine Erreger-DNA in der PCR ungenügend oder gar nicht amplifiziert, ist ein Nachweis auf dem Mikroarray schwierig, wenn nicht gar unmöglich. Beispielsweise kann dies bei effektiver Amplifikation einer Erreger-DNA in der Probe auftreten, welche durch Verbrauch der PCR-Reagenzien die Amplifikation einer anderen Erreger-DNA hemmt (HENEGARIU et al., 1997). Dies muss einerseits bei Erregern verschiedener Genera, insbesondere aber auch bei Pathogenspezies desselben Genus, welche die gleichen Primer binden, beachtet werden. Die Auswirkung auf die Sensitivität müssen in diesem Fall berücksichtigt werden (HARRUS et al., 2011b). Schon bei dem durchgeführten Mehrfachansatz mit vier verschiedenen Positivkontrollen war für die Borrelien eine deutlich schwächere Bande auf dem Gel sichtbar und deutete damit auf eine geringere Amplifikation in der Multiplex-PCR hin (Abbildung 9). Durch eine Anpassung der Primer mittels einer Primer-Konzentrations-Matrix kann dieses Problem für weitere Optimierungsschritte umgangen werden. Hierbei werden Primer von schwach amplifizierten Loci in einer höheren, Primer von gut amplifizierten Loci dagegen in geringerer Konzentration eingesetzt (HENEGARIU et al., 1997).

Noch stärker ist der Einfluss auf das Ergebnis bei Mehrfachinfektionen mit Erregern des gleichen Genus, da hauptsächlich die Spezies, deren DNA im Überschuss vorliegt, an die Primer hybridisiert. In geringerer Menge vorhandene, speziesspezifische DNA wird dadurch in geringeren Teilen amplifiziert. Der Nachweis einzelner Spezies, die in der gleichen Zeckenart als Koinfektionen vorkommen, kann somit beeinflusst werden und zu falschnegativen Ergebnissen für einzelne Speziesnachweise führen. Bei der vorliegenden Arbeit trat dies bei den DNA-Sequenzen der untersuchten Borrelienspezies auf (Tabelle 8, Zecke 113). Die Auswirkungen auf das Ergebnis müssen anhand der jeweiligen Erregerkombinationen mit unterschiedlichen Konzentrationen (zum Beispiel anhand von Primer-Konzentrations-Matrizes) weiter untersucht werden.

Die möglicherweise geringere Amplifikation einer Erreger-DNA kann teilweise durch die spezifischen Sonden des Mikroarrays ausgeglichen werden. Durch Verwendung mehrerer Sonden pro Genus und Spezies und Spotten in Triplikaten besteht die Möglichkeit, nur in

geringer Menge vorhandenes PCR-Produkt zu binden und nachzuweisen. In den durchgeführten Experimenten traf dies z. B. auf *Borrelia* spp. zu. Bei der Analyse dieser Positivkontrollen war nach Multiplex-PCR nur eine undeutliche Bande sichtbar, allerdings konnten deutlich positive Signale auf dem Mikroarray gemessen werden (vgl. Abbildungen 9 und 12). Im Allgemeinen kann die Sensitivität des Arrays durch den Einsatz längerer (> 25 bp) Sonden optimiert werden (CALL, 2005), was für weiterführende Experimente in das Design miteinbezogen werden sollte.

#### **4 Mikroarray**

Ebenso wie die PCR-Reaktion haben auch die Reaktionsbedingungen während der Hybridisierung einen Einfluss auf das Testergebnis. Die Optimierung des Hybridisierungsprotokolls resultierte durch Veränderung kritischer Parameter (Denaturierung der PCR-Produkte, Hybridisierungstemperatur und Waschschrte) in einer Erhöhung der Spezifität. Dennoch traten bei der Analyse der Positivkontrollen einzelne unspezifische Signale auf. In der Firma Alere Technologies GmbH wurden an dem optimierten Protokoll, das in der vorliegenden Arbeit erstellt wurde, weitere Veränderungen erarbeitet. Im veränderten Protokoll erfolgte die Reaktion A mit 10 µl PCR-Produkt, 57 °C Hybridisierungstemperatur und Waschen bei 45 °C für 5 min, Reaktion B mit 2 µl PCR-Produkt, 50 °C Hybridisierungstemperatur und Waschen bei 50 °C für 10 min. Mit den Reaktionsbedingungen A wurden unspezifische Signale erzeugt. Unter den Reaktionsbedingungen B war dagegen eine Unterscheidung von *Ap*, *Apl* und *Ec* möglich (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Ausschnitt aus den Analysen durchgeführt bei Alere Technologies**

**A** 10 µl PCR-Produkt, 57 °C Hybridisierungstemperatur,  
Waschen bei 45 °C für 5 min

**B** 2 µl PCR-Produkt, 50 °C Hybridisierungstemperatur,  
Waschen bei 50 °C für 10 min

Sondensignale, die als positiv gewertet wurden  
(angegebene Werte entsprechen den Signalintensitäten)

	<i>Ap</i>		<i>Apl</i>		<i>Ec</i>	
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
<b>Sonde 1</b>	0,85	0,59	0,84	0,83	0,86	0,80
<b>Sonde 2</b>	0,80	0,33	0,75	0,61	0,74	0,47
<b>Sonde 3</b>	0,81	0,20	0,86	0,60	-0,01	0,00
<b>Sonde 4</b>	0,00	-0,01	0,27	0,00	0,87	0,79
<b>Sonde 5</b>	0,76	0,34	0,31	0,16	0,45	0,31
<b>Sonde 6</b>	0,64	0,08	0,66	0,56	0,36	0,21
<b>Sonde 7</b>	0,69	0,27	0,29	0,14	0,46	0,28
<b>Sonde 8</b>	0,04	0,01	0,45	0,06	0,86	0,78
<b>Sonde 9</b>	0,78	0,42	0,85	0,67	0,06	0,03

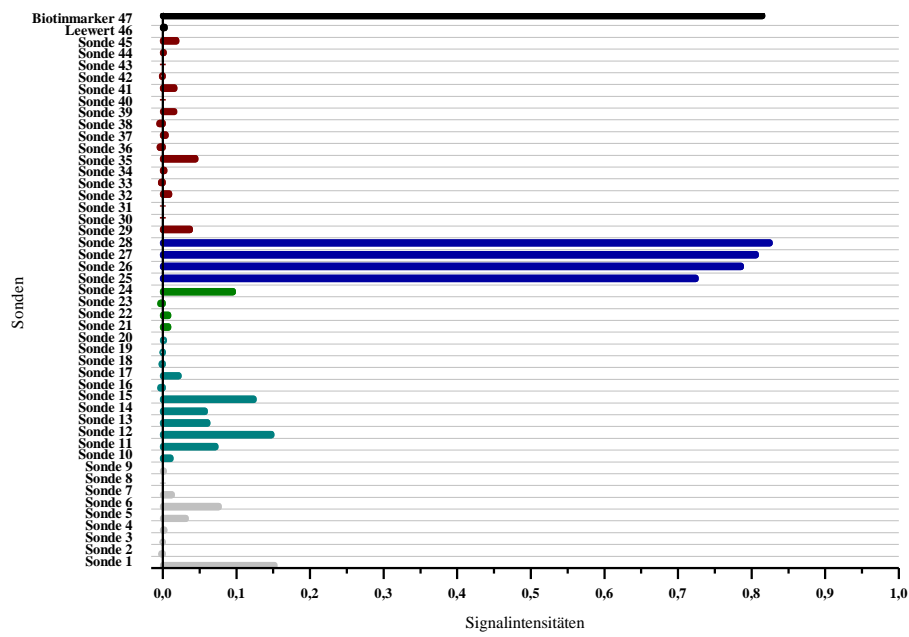
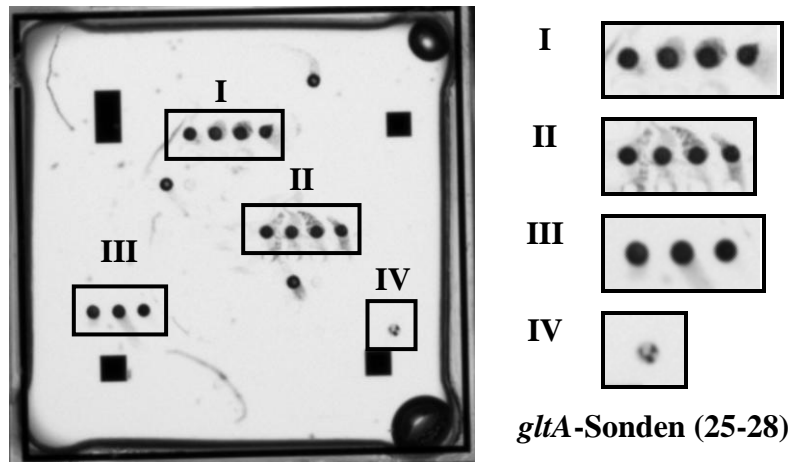
Unter den Reaktionsbedingungen B war allerdings die Sensitivität zu sehr reduziert. Für die untersuchten Borrelienspezies *B. garinii* (*Bbav*) und *Bbss* konnten unter den Reaktionsbedingungen B keinerlei Signale gemessen werden. Bei Ansätzen mit *Ap*, *Rh* und *B. afzelii* konnten sogar nur noch Signale für *Rh* erzeugt werden. Aufgrund dieser Resultate wurde für weitere Analysen das in der vorliegenden Arbeit optimierte Hybridisierungsprotokoll verwendet. Damit war die höchste Spezifität, bei gleichzeitig hoher Sensitivität, gewährleistet. Mit der Kenntnis der Zeckenart war außerdem mit dem verwendeten Protokoll die Bestimmung der Erregerspezies möglich.

## 5 Sensitivität

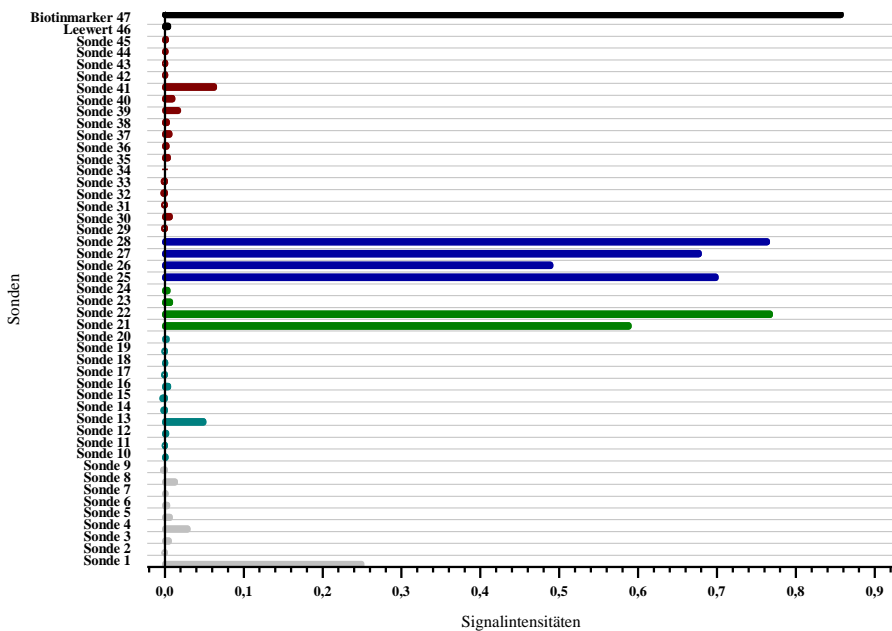
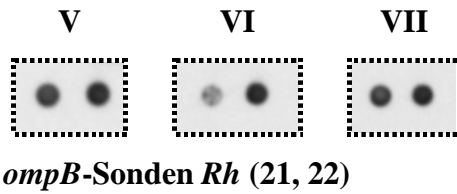
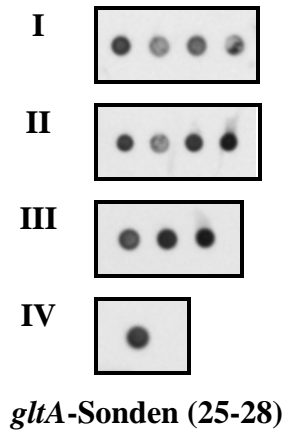
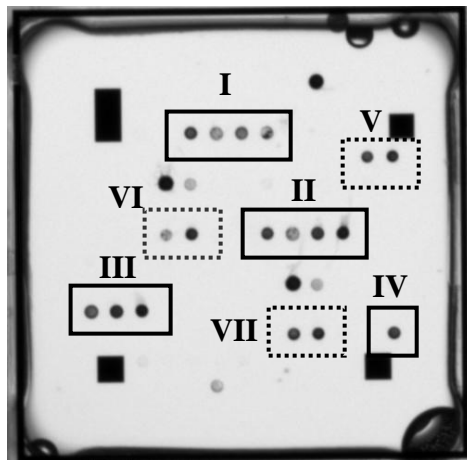
Für die ermittelten Nachweisgrenzen des Mikroarrays muss berücksichtigt werden, dass diese nur für die hier verwendeten Positivkontrollen gelten, welche aus reiner Plasmid-DNA bestanden. Für genomische DNA, welche beispielsweise aus Zecken oder Blutproben extrahiert wurde, könnten andere Nachweisgrenzen gelten, da Hintergrund-DNA (hier DNA von Zeckengewebe) eine Beeinflussung der PCR und deren Effizienz verursachen kann.

Ebenso kann das Vorhandensein mehrerer unterschiedlicher Erreger in der Probe einen Einfluss auf die PCR und damit auf die Sensitivität des Mikroarrays haben. Als Beispiel hierfür ist die folgende Mikroarray-Analyse dargestellt. Da für die Rickettsien für den Genus- und Speziesnachweis zwei unterschiedliche Gene festgelegt wurden, wurden in den Experimenten zur Bestimmung der Sensitivität einmal nur die *gltA*-Plasmide zum Nachweis des Genus *Rickettsia* in verschiedenen Verdünnungsstufen in der Multiplex-PCR eingesetzt (Abbildung 22 A). In einem anderen Ansatz wurden für die Spezies *Rh* sowohl die *gltA*- als auch die *ompB*-Positivkontrollen verdünnt und in einem Ansatz amplifiziert. Auf dem Mikroarray waren für den Ansatz, bei dem nur das *gltA*-Gen (Genusnachweis) amplifiziert wurde, Sensitivitäten bis  $10^0$  Plasmid-Kopie messbar (Abbildung 22 A). Beim gleichzeitigen Ansatz mit dem *ompB*-Gen zum Speziesnachweis waren bei der Verdünnungsstufe  $10^2$  noch beide Signale, bei der Verdünnung  $10^0$  nur noch Signale für das *ompB*-Gen nachweisbar (Abbildungen 22 B und C). Die wahrscheinlich verminderte Amplifikation des *gltA*-Gens konnte auch durch die Sonden des Mikroarrays nicht ausgeglichen werden. Dieser Fall zeigt die Hemmung der Reaktion beim Vorhandensein mehrerer Erreger bzw. unterschiedlicher DNA in einer Probe. Der dargestellte Einfluss sollte daher für die Bewertung der Sensitivität berücksichtigt werden.

22 A

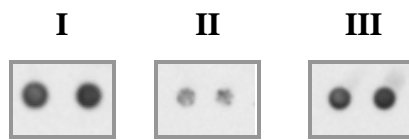
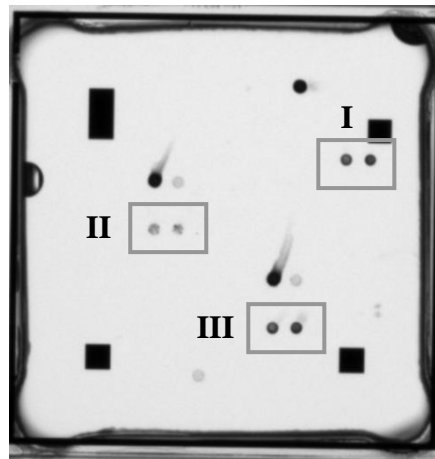


22 B





22 C



*ompB*-Sonden *Rh* (21, 22)

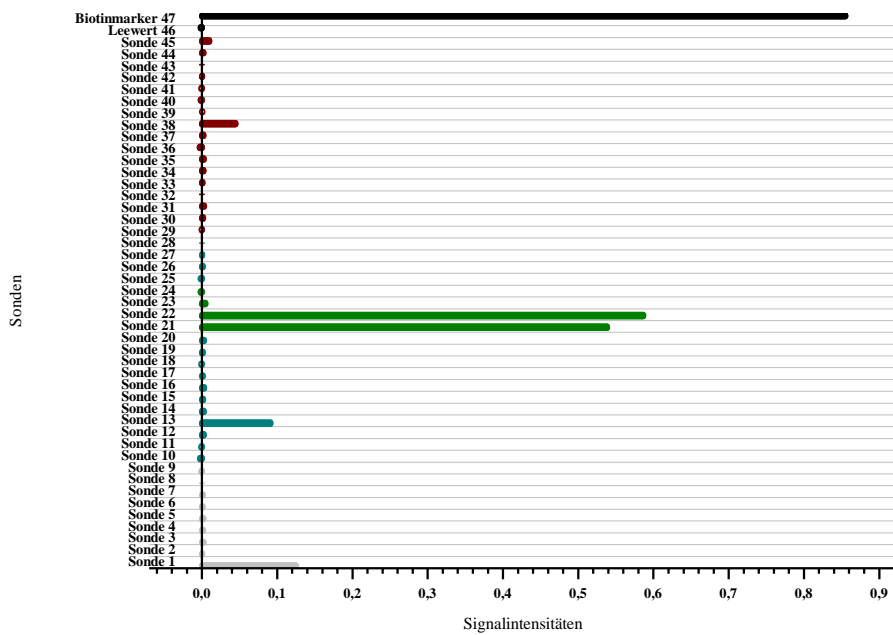


Abbildung 22: Mikroarray-Analysen mit den *Rh*-Positivkontrollen

22 A: *gltA*-Gen (Verdünnungsstufe  $10^0$  Kopie)

22 B: *gltA*- und *ompB*-Gen (Verdünnungsstufe jeweils  $10^2$  Kopien)

22 C: *gltA*- und *ompB*-Gen (Verdünnungsstufe jeweils  $10^0$  Kopien)

Da die Sensitivitäten mit Plasmid-Positivkontrollen ausgetestet wurden ist eine direkte Übertragung der Nachweisgrenzen auf genomische DNA bzw. auf die Zecken-DNA nicht möglich. Frühere Studien über den Nachweis von *Chlamydia* spp. und *Chlamydophila* spp. mit dem optimierten ArrayTube™ Format zeigten allerdings auch aus klinischen Proben vergleichbare Sensitivitäten zu real-time PCRs und lassen daher auf eine Verwendung des Mikroarrays für die klinische Routinediagnostik schließen (BOREL et al., 2008; EHRICHT et al., 2006).

## 6 Spezifität

Bei der Analyse von *Rickettsia honei*, *Rickettsia monacensis*, *Borrelia spielmanii* und *Babesia microti*-like waren die genuspezifischen Sonden positiv. Im Gegensatz dazu waren keine Signale für die speziesspezifischen Sonden messbar. Die Differenzierung dieser Pathogene zu den ausgewählten Erregerspezies ist daher mittels des entwickelten Mikroarrays möglich. Die zusätzlichen positiven Signale der Sonde 01 (Genus *Anaplasma* spp./*Ehrlichia* spp.) bei der Analyse von *Rickettsia honei* und *Rickettsia monacensis* können durch Fehlhybridisierungen der Rickettsien oder Bestandteile der Zellkulturen, in denen die Rickettsien kultiviert wurden, erklärt werden. Die positiven Signale für *Babesia* spp., die bei der Analyse von *Anaplasma marginale* auftraten, könnten durch Kreuzhybridisierungen erklärt werden. Wahrscheinlicher ist aber eine Kontamination der Probe mit Babesien-DNA, da beide Prüfungen auf Spezifität in einem Ansatz durchgeführt wurden.

## 7 Ausblick

### 7.1 Optimierung des Mikroarrays

Für eine Optimierung des entwickelten Mikroarrays ist die Anpassung der Sonden und Erhöhung der Sondenanzahl pro Genus und Spezies ausschlaggebend für eine Steigerung der Sensitivität und Spezifität. Dafür müssten entweder größere Abschnitte der bereits verwendeten Gen-Regionen oder zusätzliche Gene in den Aufbau miteinbezogen werden. Insbesondere für die 16S rRNA-basierenden Sonden zum Nachweis von *Anaplasma* spp. und *Ehrlichia* spp., die Fehlhybridisierungen mit Umweltbakterien, Endosymbionten und Pathogenen des gleichen Genus aufwiesen, müsste ein variablerer Teil der 16S rRNA, z. B. die V6-Region, als mögliches Zielgen untersucht werden. Diese V6-Region, die zwischen

den Nuklotiden 986-1043 der 16S rRNA (*Escherichia coli* 16S rRNA, komplettes Genom, Accession no. AJ605115) abgegrenzt wird, scheint eine genügend ausgeprägte Variabilität der Sequenzen zu besitzen um einzelne Bakterienspezies sicher voneinander unterscheiden zu können (CARPI et al., 2011; CHAKRAVORTY et al., 2007). Bei der Nutzung dieser spezifischen Gen-Region besteht der Vorteil, dass aufgrund der hohen Konservierung der Sequenz mit nur einem Primerpaar eine Vielzahl von Erregern amplifiziert werden kann. Außerdem sind zur 16S rRNA für viele Pathogene in der Regel genügend Daten und Sequenzmaterial verfügbar, welches für die Erstellung von Alignments eingesetzt werden kann. Der Nachteil des hohen Konservierungsgrades ist dagegen die geringere Differenzierungsmöglichkeit einzelner, besonders nahe verwandter Pathogene. Im Einzelfall müssten dabei die Sonden auf Fehlhybridisierungen überprüft werden.

Für eine spezielle *Ap*-Differenzierung würden sich auch die Gene *ankA* oder *groESL* eignen, da sie weniger stark als die 16S rRNA konserviert sind (SCHARF et al., 2011; VON LOEWENICH et al., 2003) und genügend Sequenzmaterial zur Erstellung von Alignments zur Verfügung steht.

Ebenso würde eine Erweiterung der *ospA*-Alignments für *Borrelia* spp. eine genauere Speziesdifferenzierung und eine Erhöhung der Sensitivität ermöglichen. Der zusätzliche Nachweis des Genus, der mit den in der Studie erstellten Alignments nicht möglich war, könnte beispielsweise anhand des 16S rRNA Gens oder des Flagellinprotein-Gens (WILHELMSSON et al., 2010; WODECKA et al., 2010) erreicht werden.

Für den Nachweis von *Babesia* spp. ist die Anpassung des SONDENSETS sinnvoll, um eine Steigerung der Sensitivität zu gewährleisten. Dies kann unter anderem durch die Verwendung längerer SONDENSEQUENZEN erreicht werden (CALL, 2005).

Für den entwickelten DNA-Mikroarray wurden unter anderem Gene ausgewählt, die jeweils nur einmal im Genom des Erregers vorkommen, wie zum Beispiel das *gltA*-Gen von *Rc*. Zur Steigerung der Sensitivität des Arrays wäre es sinnvoll, Gene für das Design zu verwenden, die mehrfach im Genom zu finden sind, wie beispielsweise das *msp2*-Gen, welches mit mehr als 100 Paralogen im Genom von *Ap* vorkommt, oder das *p30*-Gen von *Ec* (GRANQUIST et al., 2010; HARRUS et al., 2011b).

## 7.2 Erweiterung des Mikroarray-Designs

Für eine Weiterentwicklung des Arrays ist die Detektion zusätzlicher durch Zecken übertragener Pathogene, insbesondere mit zoonotischem Potential, von Interesse. Innerhalb der Familie der Anaplasmataceae ist dies insbesondere *Candidatus* Neoehrlichia

mikurensis. *Candidatus* Neoehrlichia bildet ein eigenes Genus innerhalb der Familie der Anaplasmataceae und wurde erstmals aus Nagetieren (*Rattus norvegicus*) und *Ixodes ovatus* aus Japan isoliert (RIKIHISA, 2006). Weiterhin konnte der Erreger in *I.-ricinus*-Zecken aus Europa durch Sequenzierung der 16S rRNA mit Prävalenzraten von gebietsweise 3,3 % bis 20,0 % nachgewiesen werden (RICHTER et al., 2012; SPITALSKA et al., 2008; VAN OVERBEEK et al., 2008). Vorhandene Fallberichte aus Human- und Veterinärmedizin beschreiben bei einer Infektion klinische Veränderungen wie Apathie, Anämie, Thrombozytopenie, reduziertes Allgemeinbefinden und Fieber bis hin zu schwerer Septikämie (DINIZ et al., 2011; FEHR et al., 2010; VON LOEWENICH et al., 2010). Durch die Behandlung mit Doxycyclin wurde in der Regel eine Verbesserung der Symptomatik bis hin zur Rekonvaleszenz erreicht. Allerdings wurde auch vermutet, dass nach Schwächung der Immunabwehr wieder eine Verschlechterung der Symptomatik eintreten kann (DINIZ et al., 2011).

Weitere durch Zecken übertragene Erreger mit klinischer Relevanz sind *Coxiella burnetii*, der Erreger des Q-Fiebers, und *Francisella tularensis*, der Erreger der Tularämie. Beide Pathogene können durch Zecken übertragen werden (DAUTEL et al., 2006; HILDEBRANDT et al., 2011b). Sie sind unter anderem in Europa verbreitet und stellen auch eine Gefahr für den Menschen dar (HILDEBRANDT et al., 2011b; MONTES et al., 2006). Bislang wird die Übertragung von *Bartonella* spp. durch Zecken noch diskutiert (ANGELAKIS et al., 2010; BILLETER et al., 2008; DINIZ et al., 2009). Koinfektionen von *Bartonella henselae*, dem Erreger der Katzen-Kratzkrankheit (cat-scratch disease), mit *Borrelia* spp. sollen zu persistenten klinischen Symptomen der LB beim Menschen geführt haben, ohne Ansprechen auf eine LB-Standardtherapie (ESKOW et al., 2001; MIETZE et al., 2011).

Bei der Analyse von Zecken kann der entwickelte Mikroarray neben Bakterien und Protozoen zudem um durch Zecken übertragene Viren erweitert werden. In Europa vorkommende virale Erreger bei Hunden und Menschen sind unter anderem die Erreger der TBE (tick-borne encephalitis) und der Louping Ill. Beide Viren können durch *I. ricinus* übertragen werden (DOBLER, 2010; PFEFFER et al., 2011).

Zur Analyse von klinischen Probenmaterialien wie Blut und Gewebe mittels Mikroarray sind weitere Erreger, unter anderem mit veterinärmedizinischer Relevanz und in Hinblick auf die Detektion von Reisekrankheiten z. B. *Hepatozoon canis*, *Dirofilaria immitis*,

*Dirofilaria repens* und *Leishmania* spp., zu berücksichtigen (DANTAS-TORRES et al., 2011b; OTRANTO et al., 2009).

Ein um die genannten Erreger erweiterter Mikroarray könnte sowohl in der Forschung, als auch in der klinischen Routinediagnostik Anwendung finden. Dabei ist von Vorteil, dass jedes Probenmaterial eingesetzt werden kann, aus dem Erreger-DNA extrahierbar ist. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit des gleichzeitigen Genus-Nachweises. Dadurch können unbekannte Erregerspezies detektiert und im Weiteren charakterisiert werden. Für diese Vorhaben ist zunächst noch die Validierung des entwickelten Assays mit klinischem Probenmaterial, unter Beachtung der jeweils vorliegenden Pathogenese und Gewebetropismus des Erregers, von Bedeutung.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass der entwickelte Assay mit der Kombination aus Multiplex-PCR und DNA-Mikroarray ein vielversprechender Ansatz ist um multiple Pathogene und Koinfektionen schnell und mit hoher Sensitivität und Spezifität nachweisen zu können.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die in Europa vorkommenden Zeckenarten *Ixodes (I.) ricinus*, *Dermacentor (D.) reticulatus* und *Rhipicephalus sanguineus* dienen als Vektoren für diverse Pathogene, welche bei Menschen und Tieren Infektionen und klinische Erkrankungen verursachen können. Häufig sind Mehrfachinfektionen im Wirt hinsichtlich des gegenseitigen Einflusses der Erreger auf die Immunpathogenese noch nicht genauer charakterisiert. Erschwerend kommt hinzu, dass die vorhandenen Nachweismethoden oft nur einzelne Pathogene erfassen und hohe Kosten entstehen, wenn mehrere Erreger nachgewiesen werden. Zudem lassen sich Krankheiten, die durch multiple, durch Zecken übertragene Pathogene verursacht werden, oft mit nur einem antibiotischen Wirkstoff therapieren, so dass bei Besserung des klinischen Allgemeinbefindens des Patienten keine weiteren Untersuchungen auf zusätzliche Infektionserreger erfolgen. Das vorhandene Wissen über Koinfektionen mit *Borrelia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. oder *Ehrlichia canis* lässt darauf schließen, dass ein synergistischer Einfluss auf das Infektionsgeschehen besteht, bei dem der jeweilige Krankheitsverlauf verschlimmert werden kann und der Therapieerfolg möglicherweise ausbleibt.

Aufgrund ihrer klinischen Bedeutung, der teilweise hohen Prävalenz in Zecken und des Risikos von Mehrfachinfektionen des Wirtes wurden die folgenden Erreger in die vorliegende Arbeit einbezogen: *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia gibsoni*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia conorii* und die relevanten Mitglieder der *Borrelia-burgdorferi-sensu-lato*-Gruppe, die in Europa durch die Erreger der Lyme-Borreliose, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, repräsentiert werden.

Um die diagnostischen Möglichkeiten insbesondere für Mehrfachinfektionen zu erweitern, wurde ein DNA-Mikroarray mit vorangestellter Multiplex-PCR entwickelt. Dieser Assay wurde anhand von Positivkontrollen und Feldproben (*I.-ricinus*- und *D.-reticulatus*-Zecken) hinsichtlich Funktionalität, Sensitivität und Spezifität validiert.

Mit dem Mikroarray war ein Nachweis der Positivkontrollen auf Genusebene und die jeweilige Speziesdifferenzierung möglich. Hinsichtlich der Sensitivität war der Mikroarray im Vergleich zur konventionellen PCR und Analyse auf Agarosegel bis zu 1000fach sensitiver und vergleichbar mit zusätzlich durchgeführten real-time PCRs für die Detektion spezifischer Gene von *Anaplasma phagocytophilum* (*msh2*) und *Borrelia* spp. (*ospA*). Die

entwickelte Methode zeigte eine hohe Spezifität bei der Untersuchung verwandter Erreger (z. B. *Borrelia spielmanii* und *Rickettsia monacensis*).

Die Analysen der Feldproben mittels Multiplex-PCR und Mikroarray ergaben, dass sich das entwickelte Verfahren zum gleichzeitigen Nachweis multipler Pathogene eignet. In den untersuchten Zecken konnten Mehrfachinfektionen mit bis zu drei verschiedenen Erregern nachgewiesen werden. Aufgrund der hohen Sensitivität der Rickettsien-spezifischen Sonden, konnten hohe Prävalenzraten (29,3 % bzw. 66,9 %) für *Rickettsia* spp. in den Zecken detektiert werden, wie bereits in der Literatur beschrieben wurde. *Babesia* spp. wurde in den untersuchten Proben nicht nachgewiesen. Vor dem Hintergrund beschriebener Prävalenzstudien und der steigenden epidemiologischen und klinischen Bedeutung diverser Babesienspezies ist eine Optimierung der Sensitivität des Nachweises von *Babesia* spp. und eine Erweiterung der zu detektierenden Spezies notwendig. Die aus der Studie resultierenden Infektionsraten von *I. ricinus* waren für *Anaplasma phagocytophilum* 0,7 % und für *Borrelia* spp. 4,0 %. Für die Steigerung der Sensitivität und Spezifität des Mikroarrays ist die Weiterentwicklung der spezifischen Sondenets erforderlich.

Die Differenzierung zu weiteren, bisher nicht auf dem Array aufgeführten Infektionserregern, zu Umweltkeimen und Endosymbionten, die mit dem verwendeten Sondenets für *Anaplasma* spp./*Ehrlichia* sp. teilweise falschpositive Ergebnisse ergaben, muss bei einer Weiterentwicklung dieses Nachweisverfahrens in Betracht gezogen werden. Neben der weiteren Optimierung des Mikroarrays zur Steigerung der Sensitivität und Spezifität ist die Erweiterung um zusätzliche Krankheitserreger wie *Leishmania* spp., *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* und *Dirofilaria* spp. von Interesse.

Aufgrund der hohen Sensitivität, Spezifität und der Möglichkeit jedes Probenmaterial, aus dem Erreger-DNA extrahiert werden kann (Blut, Serum, Tupferproben, Gewebe etc.), für die Untersuchung mittels DNA-Mikroarray zu verwenden, eignet sich der entwickelte Assay auch für epidemiologische Studien über den Eintrag von Pathogenen in nicht endemische Regionen und zum Auffinden von neuen Erregervarianten. Ebenso ist der DNA-Mikroarray, unter Beachtung der jeweils vorliegenden Pathogenese und Verbreitung der Erreger im Blut und in spezifische Gewebe, als kostengünstige, schnelle und sensitive Nachweismethode für den Einsatz in der Forschung und für die klinische Routinediagnostik denkbar.

## VII. SUMMARY

The prevalent tick species in Europe *Ixodes (I.) ricinus*, *Dermacentor (D.) reticulatus* and *Rhipicephalus sanguineus* serve as vectors for multiple pathogens, causing infections and diseases in humans and animals. Most often the impact of multiple infections on the pathogenesis of a vertebrate host is not yet characterised. The lack of specific knowledge is also owed to the common detection methods, which are often limited to a single organism, and high diagnostic costs involved when multiple tests are applied. Furthermore, many diseases, caused by multiple tick-borne pathogens, do respond to the same antibiotic therapy. So, often no further diagnostic tests are conducted, when health status improves. However, the knowledge of co-infections such as *Borrelia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. or *Ehrlichia canis* suggests a synergistic impact on the pathogenesis, leading to increased severity and duration of diseases.

Due to the clinical impact, partial high prevalence in ticks and the risk of multiple infections in the host, the following pathogens were included in the study: *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia gibsoni*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia conorii* and the prevalent members of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato group in Europe, foremost the agents of Lyme borreliosis *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto.

To enhance the possibilities of detecting multiple pathogens simultaneously, a DNA microarray based assay with Multiplex-PCR has been developed. The assay has been validated, in terms of performance, sensitivity and specificity, using positive controls and field samples (*I. ricinus* and *D. reticulatus* ticks).

Detection on genus level as well as species differentiation was possible for all positive controls. Analyses revealed an up to 1000times higher sensitivity for the microarray compared to the detection with an agarose gel. Subsequent experiments showed also comparable sensitivities to real-time PCR detecting *Anaplasma phagocytophilum* (*msp2*) and *Borrelia* spp. (*ospA*). The assay was specific when tested with related pathogens (such as *Borrelia spielmanii* and *Rickettsia monacensis*). Analysis of ticks revealed that the developed assay is suitable for detecting multiple pathogens simultaneously. Co-infections with up to three different pathogens were detected. The microarray was able to detect a high prevalence rate (29.3 % and 66.9 %) for *Rickettsia* spp. in examined ticks, as previously described in literature. *Babesia* spp. was not found in examined tick samples.



Due to previous studies and relevant emerging *Babesia* spp. the optimisation of the microarray regarding sensitivity and enlargement of the pathogen set seems to be necessary. *Ixodes ricinus* infection rates were 0.7 % for *Anaplasma phagocytophilum* and 4.0 % for *Borrelia* spp. Results from this study showed that enhancement of specific probe sets is required for increasing specificity and sensitivity.

Differentiation to related pathogens, environmental pathogens and endosymbionts of ticks has to be optimised as cross hybridisations and therefore false-positive results occurred for the designed probe set of *Anaplasma* spp./*Ehrlichia* sp. Additional pathogens, such as *Leishmania* spp., *Candidatus* *Neoehrlichia mikurensis* and *Dirofilaria* spp., should be added to the list of selected agents, especially when generating this approach for diagnostic intentions.

Notably, due to the high sensitivity and specificity, any material containing DNA of pathogens (e.g. blood, serum, tissues, swabs) can be analysed with this assay. Therefore, it enables investigations for the presence of unknown pathogen species in non-endemic areas and determination of strain variants. Equally, based on the respective pathogenesis and dissemination in blood and tissue, the developed microarray provides an economic, rapid and sensitive detection method for research and clinical samples.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Aguirre E, Tesouro MA, Ruiz L, Amusatogui I, Sainz A. Genetic characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in dogs in Spain. *J.Vet.Med.B Infect.Dis.Vet.Public Health* 2006; 53:197-200.

Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin.Chim.Acta* 2006; 363:83-94.

Alberti A, Zobba R, Chessa B, Addis MF, Sparagano O, Pinna Parpaglia ML, Cubeddu T, Pintori G, Pittau M. Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. *Appl Environ.Microbiol.* 2005; 71:6418-6422.

Amaro M, Bacellar F, Franca A. Report of eight cases of fatal and severe Mediterranean spotted fever in Portugal. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2003; 990:331-343.

Angelakis E, Billeter SA, Breitschwerdt EB, Chomel BB, Raoult D. Potential for tick-borne bartonellosis. *Emerg.Infect.Dis.* 2010; 16:385-391.

Anjum MF, Mafura M, Slickers P, Ballmer K, Kuhnert P, Woodward MJ, Ehrlich R. Pathotyping *Escherichia coli* by using miniaturized DNA microarrays. *Appl.Environ.Microbiol.* 2007; 73:5692-5697.

Appel MJ, Allan S, Jacobson RH, Lauderdale TL, Chang YF, Shin SJ, Thomford JW, Todhunter RJ, Summers BA. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *J.Infect.Dis.* 1993; 167:651-664.

Barbour AG. Laboratory aspects of Lyme borreliosis. *Clin.Microbiol.Rev.* 1988; 1:399-414.

Beall MJ, Chandrashekar R, Eberts MD, Cyr KE, Diniz PP, Mainville C, Hegarty BC, Crawford JM, Breitschwerdt EB. Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* species in dogs from Minnesota. *Vector.Borne.Zoonotic.Dis.* 2008; 8:455-464.

- Belongia EA. Epidemiology and impact of coinfections acquired from Ixodes ticks. *Vector.Borne.Zoonotic.Dis.* 2002; 2:265-273.
- Beninati T, Lo N, Sacchi L, Genchi C, Noda H, Bandi C. A novel alpha-Proteobacterium resides in the mitochondria of ovarian cells of the tick Ixodes ricinus. *Appl.Environ.Microbiol.* 2004; 70:2596-2602.
- Beugnet F, Kolasinski M, Michelangeli PA, Vienne J, Loukos H. Mathematical modelling of the impact of climatic conditions in France on Rhipicephalus sanguineus tick activity and density since 1960. *Geospat.Health* 2011; 5:255-263.
- Beugnet F, Marie JL. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet Parasitol.* 2009; 163:298-305.
- Billeter SA, Levy MG, Chomel BB, Breitschwerdt EB. Vector transmission of Bartonella species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med.Vet.Entomol.* 2008; 22:1-15.
- Birkenheuer AJ, Correa MT, Levy MG, Breitschwerdt EB. Geographic distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dog bites: 150 cases (2000-2003). *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 2005; 227:942-947.
- Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of Babesia gibsoni (Asian genotype) and B. canis DNA in canine blood samples. *J.Clin.Microbiol.* 2003; 41:4172-4177.
- Borel N, Kempf E, Hotzel H, Schubert E, Torgerson P, Slickers P, Ehrlich R, Tasara T, Pospischil A, Sachse K. Direct identification of chlamydiae from clinical samples using a DNA microarray assay: a validation study. *Mol.Cell Probes* 2008; 22:55-64.
- Boretti FS, Perreten A, Meli ML, Cattori V, Willi B, Wengi N, Hornok S, Honegger H, Heggin D, Woelfel R, Reusch CE, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Molecular Investigations of Rickettsia helvetica infection in dogs, foxes, humans, and Ixodes ticks. *Appl Environ.Microbiol.* 2009; 75:3230-3237.
- Bourdoiseau G. Canine babesiosis in France. *Vet Parasitol.* 2006; 138:118-125.
- Bowman D, Little SE, Lorentzen L, Shields J, Sullivan MP, Carlin EP. Prevalence and geographic distribution of Dirofilaria immitis, Borrelia burgdorferi, Ehrlichia canis, and

*Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: results of a national clinic-based serologic survey. *Vet.Parasitol.* 2009; 160:138-148.

Brown WC. Unraveling the immune regulatory mechanisms imposed by *Anaplasma*. *Vet J* 2008; 175:10-11.

Brown WC. Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: Implications for bacterial persistence. *Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis.* 2012.

Caccio SM, Antunovic B, Moretti A, Mangili V, Marinculic A, Baric RR, Slemenda SB, Pieniasek NJ. Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. *Vet.Parasitol.* 2002; 106:285-292.

Call DR. Challenges and opportunities for pathogen detection using DNA microarrays. *Crit Rev.Microbiol.* 2005; 31:91-99.

Camacho AT, Guitian EJ, Pallas E, Gestal JJ, Olmeda AS, Goethert HK, Telford SR, III, Spielman A. Azotemia and mortality among *Babesia microti*-like infected dogs. *J.Vet.Intern.Med.* 2004; 18:141-146.

Cardoso L, Tuna J, Vieira L, Yisaschar-Mekuzas Y, Baneth G. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. *Vet.J.* 2010b; 183:232-233.

Cardoso L, Yisaschar-Mekuzas Y, Rodrigues FT, Costa A, Machado J, Diz-Lopes D, Baneth G. Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections. *Parasit.Vectors.* 2010a; 3:27.

Carpi G, Cagnacci F, Wittekindt NE, Zhao F, Qi J, Tomsho LP, Drautz DI, Rizzoli A, Schuster SC. Metagenomic Profile of the Bacterial Communities Associated with *Ixodes ricinus* Ticks. *PLoS.One.* 2011; 6:e25604.

Carrade DD, Foley JE, Borjesson DL, Sykes JE. Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *J.Vet.Intern.Med.* 2009; 23:1129-1141.

Chae JS, Foley JE, Dumler JS, Madigan JE. Comparison of the nucleotide sequences of 16S rRNA, 444 Ep-ank, and groESL heat shock operon genes in naturally occurring *Ehrlichia equi* and human granulocytic ehrlichiosis agent isolates from Northern California. *J.Clin.Microbiol.* 2000; 38:1364-1369.

Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J.Microbiol.Methods* 2007; 69:330-339.

Chang YF, Novosel V, Dubovi E, Wong SJ, Chu FK, Chang CF, Del PF, Shin S, Lein DH. Experimental infection of the human granulocytic ehrlichiosis agent in horses. *Vet.Parasitol.* 1998; 78:137-145.

Choi KS, Garyu J, Park J, Dumler JS. Diminished adhesion of *Anaplasma phagocytophilum*-infected neutrophils to endothelial cells is associated with reduced expression of leukocyte surface selectin. *Infect.Immun.* 2003; 71:4586-4594.

Chomel B. Tick-borne infections in dogs-an emerging infectious threat. *Vet Parasitol.* 2011; 179:294-301.

Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin.Microbiol.Rev.* 2004; 17:840-62, table.

Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, Massung RF. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J.Clin.Microbiol.* 2004; 42:3164-3168.

Criado-Fornelio A, Gonzalez-del-Rio MA, Buling-Sarana A, Barba-Carretero JC. Molecular characterization of a *Babesia gibsoni* isolate from a Spanish dog. *Vet.Parasitol.* 2003; 117:123-129.

Dantas-Torres F, Giannelli A, Otranto D. Starvation and overwinter do not affect the reproductive fitness of *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet Parasitol.* 2011a.

Dantas-Torres F, Latrofa MS, Weigl S, Tarallo VD, Lia RP, Otranto D. Hepatozoon canis infection in ticks during spring and summer in Italy. *Parasitol.Res.* 2011b.

Dautel H, Dippel C, Oehme R, Hartelt K, Schettler E. Evidence for an increased geographical distribution of *Dermacentor reticulatus* in Germany and detection of *Rickettsia* sp. RpA4. *Int.J.Med.Microbiol.* 2006; 296 Suppl 40:149-156.

Day MJ. The immunopathology of canine vector-borne diseases. *Parasit.Vectors.* 2011; 4:48.

de Caprariis D, Dantas-Torres F, Capelli G, Mencke N, Stanneck D, Breitschwerdt EB, Otranto D. Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. *Vet.Microbiol.* 2011; 149:206-212.

de Carvalho IL, Santos N, Soares T, Ze-Ze L, Nuncio MS. Francisella-like endosymbiont in *Dermacentor reticulatus* collected in Portugal. *Vector.Borne.Zoonotic.Dis.* 2011; 11:185-188.

de la Fuente J, Torina A, Naranjo V, Nicosia S, Alongi A, La MF, Kocan KM. Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. *BMC.Vet.Res.* 2006; 2:24.

De Leeneer K, Hellemans J, De SJ, Baetens M, Poppe B, Van CW, De PA, Coucke P, Claes K. Massive parallel amplicon sequencing of the breast cancer genes BRCA1 and BRCA2: opportunities, challenges, and limitations. *Hum.Mutat.* 2011; 32:335-344.

Demaerschalck I, Ben MA, De KM, Hoyois B, Lobet Y, Hoet P, Bigaignon G, Bollen A, Godfroid E. Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J.Clin.Microbiol.* 1995; 33:602-608.

Diniz PP, Billeter SA, Otranto D, de CD, Petanides T, Mylonakis ME, Koutinas AF, Breitschwerdt EB. Molecular documentation of *Bartonella* infection in dogs in Greece and Italy. *J.Clin.Microbiol.* 2009; 47:1565-1567.

Diniz PP, Schulz BS, Hartmann K, Breitschwerdt EB. "Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*" infection in a dog from Germany. *J.Clin.Microbiol.* 2011; 49:2059-2062.

Dobec M, Golubic D, Punda-Polic V, Kaeppli F, Sievers M. *Rickettsia helvetica* in *Dermacentor reticulatus* ticks. *Emerg.Infect.Dis.* 2009; 15:98-100.

Dobler G. Zoonotic tick-borne flaviviruses. *Vet Microbiol.* 2010; 140:221-228.

Dobler G, Wolfel R. Typhus and other rickettsioses: emerging infections in Germany. *Dtsch.Arztbl.Int.* 2009; 106:348-354.

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; 109:245-248.

Dugat-Bony E, Peyretailade E, Parisot N, Biderre-Petit C, Jaziri F, Hill D, Rimour S, Peyret P. Detecting unknown sequences with DNA microarrays: explorative probe design strategies. *Environ.Microbiol.* 2011.

Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'I agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 2001; 51:2145-2165.

Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, Grab DJ, Bakken JS. Human granulocytic anaplasmosis and Anaplasma phagocytophilum. *Emerg.Infect.Dis.* 2005; 11:1828-1834.

Eddlestone SM, Diniz PP, Neer TM, Gaunt SD, Corstvet R, Cho D, Hosgood G, Hegarty B, Breitschwerdt EB. Doxycycline clearance of experimentally induced chronic Ehrlichia canis infection in dogs. *J.Vet.Intern.Med.* 2007a; 21:1237-1242.

Eddlestone SM, Gaunt SD, Neer TM, Boudreaux CM, Gill A, Haschke E, Corstvet RE. PCR detection of Anaplasma platys in blood and tissue of dogs during acute phase of experimental infection. *Exp.Parasitol.* 2007b; 115:205-210.

Egenvall A, Bjoersdorff A, Lilliehook I, Olsson EE, Karlstam E, Artursson K, Hedhammar A, Gunnarsson A. Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish Ehrlichia species isolate. *Vet.Rec.* 1998; 143:412-417.

Egenvall A, Lilliehook I, Bjoersdorff A, Engvall EO, Karlstam E, Artursson K, Heldtander M, Gunnarsson A. Detection of granulocytic Ehrlichia species DNA by PCR in persistently infected dogs. *Vet.Rec.* 2000; 146:186-190.

Ehricht R, Slickers P, Goellner S, Hotzel H, Sachse K. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol.Cell Probes* 2006; 20:60-63.

Eiffert H, Karsten A, Thomssen R, Christen HJ. Characterization of Borrelia burgdorferi strains in Lyme arthritis. *Scand.J.Infect.Dis.* 1998; 30:265-268.

Embers ME, Alvarez X, Ooms T, Philipp MT. The failure of immune response evasion by linear plasmid 28-1-deficient *Borrelia burgdorferi* is attributable to persistent expression of an outer surface protein. *Infect.Immun.* 2008; 76:3984-3991.

Embers ME, Barthold SW, Borda JT, Bowers L, Doyle L, Hodzic E, Jacobs MB, Hasenkampf NR, Martin DS, Narasimhan S, Phillippi-Falkenstein KM, Purcell JE, Ratterree MS, Philipp MT. Persistence of *Borrelia burgdorferi* in Rhesus Macaques following Antibiotic Treatment of Disseminated Infection. *PLoS.One.* 2012; 7:e29914.

Escudero R, Barral M, Perez A, Vitutia MM, Garcia-Perez AL, Jimenez S, Sellek RE, Anda P. Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Spain. *J Clin.Microbiol.* 2000; 38:4026-4033.

Eskow E, Rao RV, Mordechai E. Concurrent infection of the central nervous system by *Borrelia burgdorferi* and *Bartonella henselae*: evidence for a novel tick-borne disease complex. *Arch.Neurol.* 2001; 58:1357-1363.

Fehr JS, Bloemberg GV, Ritter C, Hombach M, Luscher TF, Weber R, Keller PM. Septicemia caused by tick-borne bacterial pathogen *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. *Emerg.Infect.Dis.* 2010; 16:1127-1129.

Fingerle V, Schulte-Spechtel UC, Ruzic-Sabljić E, Leonhard S, Hofmann H, Weber K, Pfister K, Strle F, Wilske B. Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int.J.Med.Microbiol.* 2008; 298:279-290.

Fournier PE, Allombert C, Supputamongkol Y, Caruso G, Brouqui P, Raoult D. Aneruptive fever associated with antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand. *J.Clin.Microbiol.* 2004; 42:816-818.

Fournier PE, Raoult D. Current knowledge on phylogeny and taxonomy of *Rickettsia* spp. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2009; 1166:1-11.

Franzen P, Aspan A, Egenvall A, Gunnarsson A, Karlstam E, Pringle J. Molecular evidence for persistence of *Anaplasma phagocytophilum* in the absence of clinical abnormalities in horses after recovery from acute experimental infection. *J.Vet.Intern.Med.* 2009; 23:636-642.



- Fukumoto S, Suzuki H, Igarashi I, Xuan X. Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Int.J Parasitol.* 2005; 35:1031-1035.
- Gal A, Harrus S, Arcoh I, Lavy E, Aizenberg I, Mekuzas-Yisaschar Y, Baneth G. Coinfection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6-week-old dog. *Can.Vet.J.* 2007; 48:619-622.
- Gal A, Loeb E, Yisaschar-Mekuzas Y, Baneth G. Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Vet.J.* 2008; 175:212-217.
- Garcia-Garcia JC, Barat NC, Trembley SJ, Dumler JS. Epigenetic silencing of host cell defense genes enhances intracellular survival of the rickettsial pathogen *Anaplasma phagocytophilum*. *PLoS.Pathog.* 2009; 5:e1000488.
- Gaunt S, Beall M, Stillman B, Lorentzen L, Diniz P, Chandrashekar R, Breitschwerdt E. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasit.Vectors.* 2010; 3:33.
- Georges K, Loria GR, Riili S, Greco A, Caracappa S, Jongejan F, Sparagano O. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet.Parasitol.* 2001; 99:273-286.
- Gouin E, Egile C, Dehoux P, Villiers V, Adams J, Gertler F, Li R, Cossart P. The RickA protein of *Rickettsia conorii* activates the Arp2/3 complex. *Nature* 2004; 427:457-461.
- Granquist EG, Stuen S, Crosby L, Lundgren AM, Alleman AR, Barbet AF. Variant-specific and diminishing immune responses towards the highly variable MSP2(P44) outer membrane protein of *Anaplasma phagocytophilum* during persistent infection in lambs. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 2010; 133:117-124.
- Greene CE. *Infectious Diseases Of The Dog And Cat*. 4<sup>th</sup> edition: 2012
- Hamel D, Silaghi C, Lescai D, Pfister K. Epidemiological aspects on vector-borne infections in stray and pet dogs from Romania and Hungary with focus on *Babesia* spp. *Parasitol.Res.* 2011.

Harrus S, Lior Y, Ephros M, Grisaru-Soen G, Keysary A, Strenger C, Jongejan F, Waner T, Baneth G. *Rickettsia conorii* in humans and dogs: a seroepidemiologic survey of two rural villages in Israel. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2007; 77:133-135.

Harrus S, Perlman-Avrahami A, Mumcuoglu KY, Morick D, Eyal O, Baneth G. Molecular detection of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma platys*, *Candidatus Midichloria mitochondrii* and *Babesia canis vogeli* in ticks from Israel. *Clin.Microbiol.Infect.* 2011a; 17:459-463.

Harrus S, Waner T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet J* 2011b; 187:292-296.

Harrus S, Waner T, Aizenberg I, Foley JE, Poland AM, Bark H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *J.Clin.Microbiol.* 1998; 36:73-76.

Hartelt K, Oehme R, Frank H, Brockmann SO, Hassler D, Kimmig P. Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. *Int.J.Med.Microbiol.* 2004; 293 Suppl 37:86-92.

Hartelt K, Rieker T, Oehme RM, Brockmann SO, Muller W, Dorn N. First evidence of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) in dogs in Western Europe. *Vector.Borne.Zoonotic.Dis.* 2007; 7:163-166.

Hartiala P, Hytonen J, Suhonen J, Lepparanta O, Tuominen-Gustafsson H, Viljanen MK. *Borrelia burgdorferi* inhibits human neutrophil functions. *Microbes.Infect.* 2008; 10:60-68.

Harvey JW, Simpson CF, Gaskin JM. Cyclic thrombocytopenia induced by a *Rickettsia*-like agent in dogs. *J.Infect.Dis.* 1978; 137:182-188.

Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 1997; 23:504-511.

Hildebrandt A, Franke J, Schmoock G, Pauliks K, Kramer A, Straube E. Diversity and coexistence of tick-borne pathogens in central Germany. *J.Med.Entomol.* 2011a; 48:651-655.

- Hildebrandt A, Straube E, Neubauer H, Schmoock G. *Coxiella burnetii* and coinfections in *Ixodes ricinus* ticks in Central Germany. *Vector.Borne.Zoonotic.Dis.* 2011b; 11:1205-1207.
- Hovius KE, Stark LA, Bleumink-Pluym NM, Van DP, I, Verbeek-de KN, Rijpkema SG, Schouls LM, Houwers DJ. Presence and distribution of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species in internal organs and skin of naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs, as detected by polymerase chain reaction. *Vet.Q.* 1999; 21:54-58.
- Inokuma H, Seino N, Suzuki M, Kaji K, Takahashi H, Igota H, Inoue S. Detection of *Rickettsia helvetica* DNA from peripheral blood of Sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Japan. *J Wildl.Dis.* 2008; 44:164-167.
- Irwin PJ. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit.Vectors.* 2009; 2 Suppl 1:S4.
- Jefferies R, Ryan UM, Jardine J, Broughton DK, Robertson ID, Irwin PJ. Blood, Bull Terriers and Babesiosis: further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. *Aust.Vet J* 2007; 85:459-463.
- Johnson EM, Ewing SA, Barker RW, Fox JC, Crow DW, Kocan KM. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Vet.Parasitol.* 1998; 74:277-288.
- Kallick CA. Ehrlichia and bone marrow cells: could Ehrlichial infection explain the unsuspected etiology of some diseases of the immune system? *Med Hypotheses* 2011; 77:374-379.
- Kjemtrup AM, Conrad PA. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *Int.J Parasitol.* 2000; 30:1323-1337.
- Knauer J, Siegemund S, Muller U, Al-Robaiy S, Kastelein RA, Alber G, Straubinger RK. *Borrelia burgdorferi* potently activates bone marrow-derived conventional dendritic cells for production of IL-23 required for IL-17 release by T cells. *FEMS Immunol.Med Microbiol.* 2007; 49:353-363.
- Kohn B, Silaghi C, Galke D, Arndt G, Pfister K. Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Res.Vet.Sci.* 2010.

Kordick SK, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Southwick KL, Colitz CM, Hancock SI, Bradley JM, Rumbough R, Mcpherson JT, MacCormack JN. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. *J.Clin.Microbiol.* 1999; 37:2631-2638.

Krause PJ, McKay K, Thompson CA, Sikand VK, Lentz R, Lepore T, Closter L, Christianson D, Telford SR, Persing D, Radolf JD, Spielman A. Disease-specific diagnosis of coinfecting tickborne zoonoses: babesiosis, human granulocytic ehrlichiosis, and Lyme disease. *Clin.Infect.Dis.* 2002; 34:1184-1191.

Krause PJ, Telford SR, III, Spielman A, Sikand V, Ryan R, Christianson D, Burke G, Brassard P, Pollack R, Peck J, Persing DH. Concurrent Lyme disease and babesiosis. Evidence for increased severity and duration of illness. *JAMA* 1996; 275:1657-1660.

Krupka I, Knauer J, Lorentzen L, O'Connor TP, Saucier J, Straubinger RK. *Borrelia burgdorferi sensu lato* species in Europe induce diverse immune responses against C6 peptides in infected mice. *Clin.Vaccine Immunol.* 2009; 16:1546-1562.

Krupka I, Pantchev N, Lorentzen L, Weise M, Straubinger RK. Durch Zecken übertragbare bakterielle Infektionen bei Hunden: Seroprävalenzen von *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* und *Ehrlichia canis* in Deutschland. *Praktischer Tierarzt* 2007; 88:776-788.

Krupka I, Straubinger RK. Lyme borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infections with *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *Vet Clin. North Am. Small Anim Pract.* 2010; 40:1103-1119.

Levin ML, Killmaster LF, Zemtsova GE. Domestic Dogs (*Canis familiaris*) as Reservoir Hosts for *Rickettsia conorii*. *Vector.Borne.Zoonotic.Dis.* 2011.

Little SE, Heise SR, Blagburn BL, Callister SM, Mead PS. Lyme borreliosis in dogs and humans in the USA. *Trends Parasitol.* 2010; 26:213-218.

Lo N, Beninati T, Sasser D, Bouman EA, Santagati S, Gern L, Sambri V, Masuzawa T, Gray JS, Jaenson TG, Bouattour A, Kenny MJ, Guner ES, Kharitonov IG, Bitam I, Bandi C. Widespread distribution and high prevalence of an alpha-proteobacterial symbiont in the tick *Ixodes ricinus*. *Environ.Microbiol.* 2006; 8:1280-1287.

- M'ghirbi Y, Ghorbel A, Amouri M, Nebaoui A, Haddad S, Bouattour A. Clinical, serological, and molecular evidence of ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs in Tunisia. *Parasitol.Res.* 2009; 104:767-774.
- Marchuk D, Drumm M, Saulino A, Collins FS. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19:1154.
- Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* 2008; 9:387-402.
- Margos G, Vollmer SA, Cornet M, Garnier M, Fingerle V, Wilske B, Bormane A, Vitorino L, Collares-Pereira M, Drancourt M, Kurtenbach K. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl.Environ.Microbiol.* 2009; 75:5410-5416.
- Margos G, Vollmer SA, Ogden NH, Fish D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Infect.Genet.Evol.* 2011; 11:1545-1563.
- McBride JW, Corstvet RE, Gaunt SD, Chinsangaram J, Akita GY, Osburn BI. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. *J.Vet.Diagn.Invest* 1996; 8:441-447.
- Mietze A, Strube C, Beyersbach M, Schnieder T, Goethe R. Occurrence of *Bartonella henselae* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* co-infections in ticks collected from humans in Germany. *Clin.Microbiol.Infect.* 2011; 17:918-920.
- Monecke S, Ehrlich R. Rapid genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates using miniaturised oligonucleotide arrays. *Clin.Microbiol.Infect.* 2005; 11:825-833.
- Montes M, Cilla G, Vicente D, Nieto V, Ercibengoa M, Perez-Trallero E. Gipuzkoa, Basque Country, Spain (1984-2004): a hyperendemic area of Q fever. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2006; 1078:129-132.
- Mumcuoglu KY, Frish K, Sarov B, Manor E, Gross E, Gat Z, Galun R. Ecological studies on the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in southern Israel and its relationship to spotted fever group rickettsiae. *J Med Entomol.* 1993; 30:114-121.

Murphy GL, Ewing SA, Whitworth LC, Fox JC, Kocan AA. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet.Parasitol.* 1998; 79:325-339.

Mylonakis ME, Koutinas AF, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Billinis CD, Leontides LS, Kontos VS. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. *J Am.Anim Hosp.Assoc.* 2004; 40:174-184.

Nicholson WL, Allen KE, McQuiston JH, Breitschwerdt EB, Little SE. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends Parasitol.* 2010; 26:205-212.

Nieto NC, Foley JE. Meta-analysis of coinfection and coexposure with *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in humans, domestic animals, wildlife, and *Ixodes ricinus*-complex ticks. *Vector.Borne.Zoonotic.Dis.* 2009; 9:93-102.

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

Novais RC, Thorstenson YR. The evolution of PyrosequencingI for microbiology: From genes to genomes. *J Microbiol.Methods* 2011; 86:1-7.

Otranto D, Capelli G, Genchi C. Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. *Parasit.Vectors.* 2009; 2 Suppl 1:S2.

Otranto D, Dantas-Torres F. Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasit.Vectors.* 2010; 3:2.

Pahl A, Kuhlbrandt U, Brune K, Rollinghoff M, Gessner A. Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real-time PCR. *J Clin.Microbiol.* 1999; 37:1958-1963.

Palmer GH, Bankhead T, Lukehart SA. 'Nothing is permanent but change'- antigenic variation in persistent bacterial pathogens. *Cell Microbiol.* 2009; 11:1697-1705.

Parola P, Davoust B, Raoult D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet.Res.* 2005b; 36:469-492.

Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin.Microbiol.Rev.* 2005a; 18:719-756.

- Peleg O, Baneth G, Eyal O, Inbar J, Harrus S. Multiplex real-time qPCR for the detection of Ehrlichia canis and Babesia canis vogeli. *Vet Parasitol.* 2010; 173:292-299.
- Pfeffer M, Dobler G. Tick-borne encephalitis virus in dogs--is this an issue? *Parasit.Vectors.* 2011; 4:59.
- Poitout FM, Shinozaki JK, Stockwell PJ, Holland CJ, Shukla SK. Genetic variants of Anaplasma phagocytophilum infecting dogs in Western Washington State. *J.Clin.Microbiol.* 2005; 43:796-801.
- Pusterla N, Huder J, Wolfensberger C, Litschi B, Parvis A, Lutz H. Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland. *J.Clin.Microbiol.* 1997; 35:2307-2309.
- Ramamoorthi N, Narasimhan S, Pal U, Bao F, Yang XF, Fish D, Anguita J, Norgard MV, Kantor FS, Anderson JF, Koski RA, Fikrig E. The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature* 2005; 436:573-577.
- Raoult D, Gallais H, Ottomani A, Resch JP, Tichadou D, De MP, Casanova P. [Malignant form of Mediterranean boutonuse fever. 6 cases]. *Presse Med* 1983; 12:2375-2378.
- Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin.Microbiol.Rev.* 1997; 10:694-719.
- Rar V, Golovljova I. Anaplasma, Ehrlichia, and "Candidatus Neoehrlichia" bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infect.Genet.Evol.* 2011; 11:1842-1861.
- Rauter C, Hartung T. Prevalence of Borrelia burgdorferi sensu lato genospecies in Ixodes ricinus ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl.Environ.Microbiol.* 2005; 71:7203-7216.
- Rauter C, Oehme R, Diterich I, Engele M, Hartung T. Distribution of clinically relevant Borrelia genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR. *J.Clin.Microbiol.* 2002; 40:36-43.
- Ravnik U, Tozon N, Smrdel KS, Zupanc TA. Anaplasmosis in dogs: the relation of haematological, biochemical and clinical alterations to antibody titre and PCR confirmed infection. *Vet.Microbiol.* 2011; 149:172-176.

Reye AL, Hubschen JM, Sausy A, Muller CP. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Appl.Environ.Microbiol.* 2010; 76:2923-2931.

Richter D, Matuschka FR. "Candidatus *Neohrlichia mikurensis*", *Anaplasma phagocytophilum* and Lyme disease spirochetes in questing European vector ticks and in feeding ticks removed from people. *J Clin.Microbiol.* 2012.

Rieg S, Schmoltdt S, Theilacker C, de WK, Wolfel S, Kern WV, Dobler G. Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA) acquired in Southwestern Germany. *BMC.Infect.Dis.* 2011; 11:167.

Rikihisa Y. New findings on members of the family Anaplasmataceae of veterinary importance. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2006; 1078:438-445.

Roh SW, Abell GC, Kim KH, Nam YD, Bae JW. Comparing microarrays and next-generation sequencing technologies for microbial ecology research. *Trends Biotechnol.* 2010; 28:291-299.

Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *Int.J Syst.Evol.Microbiol.* 2000; 50 Pt 4:1449-1455.

Rudolf I, Mendel J, Sikutova S, Svec P, Masarikova J, Novakova D, Bunkova L, Sedlacek I, Hubalek Z. 16S rRNA gene-based identification of cultured bacterial flora from host-seeking *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* ticks, vectors of vertebrate pathogens. *Folia Microbiol.(Praha)* 2009; 54:419-428.

Rymaszewska A, Adamska M. Molecular evidence of vector-borne pathogens coinfecting dogs from Poland. *Acta Vet.Hung.* 2011; 59:215-223.

Sacchi L, Bigliardi E, Corona S, Beninati T, Lo N, Franceschi A. A symbiont of the tick *Ixodes ricinus* invades and consumes mitochondria in a mode similar to that of the parasitic bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Tissue Cell* 2004; 36:43-53.

Sassera D, Beninati T, Bandi C, Bouman EA, Sacchi L, Fabbi M, Lo N. 'Candidatus *Midichloria mitochondrii*', an endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 2006; 56:2535-2540.



- Sassera D, Lo N, Bouman EA, Epis S, Mortarino M, Bandi C. "Candidatus Midichloria" endosymbionts bloom after the blood meal of the host, the hard tick *Ixodes ricinus*. *Appl Environ.Microbiol.* 2008; 74:6138-6140.
- Schaarschmidt-Kiener D, Graf F, von Loewenich FD, Muller W. [Anaplasma phagocytophilum infection in a cat in Switzerland]. *Schweiz.Arch.Tierheilkd.* 2009; 151:336-341.
- Scharf W, Schauer S, Freyburger F, Petrovec M, Schaarschmidt-Kiener D, Liebisch G, Runge M, Ganter M, Kehl A, Dumler JS, Garcia-Perez AL, Jensen J, Fingerle V, Meli ML, Ensser A, Stuen S, von Loewenich FD. Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum* ankA gene clusters. *J Clin.Microbiol.* 2011; 49:790-796.
- Schorn S, Pfister K, Reulen H, Mahling M, Silaghi C. Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Parasit.Vectors.* 2011; 4:135.
- Scorpio DG, Dumler JS, Barat NC, Cook JA, Barat CE, Stillman BA, DeBisceglie KC, Beall MJ, Chandrashekar R. Comparative strain analysis of *Anaplasma phagocytophilum* infection and clinical outcomes in a canine model of granulocytic anaplasmosis. *Vector.Borne.Zoonotic.Dis.* 2011; 11:223-229.
- Seiler KP, Weis JJ. Immunity to Lyme disease: protection, pathology and persistence. *Curr.Opin.Immunol.* 1996; 8:503-509.
- Senneville E, Ajana F, Lecocq P, Chidiac C, Mouton Y. *Rickettsia conorii* isolated from ticks introduced to northern France by a dog. *Lancet* 1991; 337:676.
- Severinsson K, Jaenson TG, Pettersson J, Falk K, Nilsson K. Detection and prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in seven study areas in Sweden. *Parasit.Vectors.* 2010; 3:66.
- Shaw SE, Day MJ, Birtles RJ, Breitschwerdt EB. Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends Parasitol.* 2001; 17:74-80.
- Silaghi C, Gilles J, Hohle M, Pradel I, Just FT, Fingerle V, Kuchenhoff H, Pfister K. Prevalence of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in southern Germany. *J.Med.Entomol.* 2008; 45:948-955.

Silaghi C, Hamel D, Thiel C, Pfister K, Pfeffer M. Spotted Fever group rickettsiae in ticks, Germany. *Emerg.Infect.Dis.* 2011; 17:890-892.

Simpson RM, Gaunt SD, Hair JA, Kocan KM, Henk WG, Casey HW. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. *Am.J Vet Res* 1991; 52:1537-1541.

Sirigireddy KR, Ganta RR. Multiplex detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* species pathogens in peripheral blood by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Mol.Diagn.* 2005; 7:308-316.

Socolovschi C, Mediannikov O, Raoult D, Parola P. The relationship between spotted fever group Rickettsiae and ixodid ticks. *Vet Res* 2009; 40:34.

Solano-Gallego L, Baneth G. Babesiosis in dogs and cats-Expanding parasitological and clinical spectra. *Vet.Parasitol.* 2011.

Solano-Gallego L, Kidd L, Trotta M, Di MM, Caldin M, Furlanello T, Breitschwerdt E. Febrile illness associated with *Rickettsia conorii* infection in dogs from Sicily. *Emerg.Infect.Dis.* 2006; 12:1985-1988.

Solano-Gallego L, Trotta M, Carli E, Carcy B, Caldin M, Furlanello T. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Vet.Parasitol.* 2008; 157:211-221.

Speck S, Reiner B, Wittenbrink MM. Isolation of *Borrelia afzelii* from a dog. *Vet.Rec.* 2001; 149:19-20.

Spitalska E, Boldis V, Kostanova Z, Kocianova E, Stefanidesova K. Incidence of various tick-borne microorganisms in rodents and ticks of central Slovakia. *Acta Virol.* 2008; 52:175-179.

Stegeman JR, Birkenheuer AJ, Kruger JM, Breitschwerdt EB. Transfusion-associated *Babesia gibsoni* infection in a dog. *J Am.Vet Med Assoc.* 2003; 222:959-63, 952.

Straubinger RK. PCR-Based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-Day postinfection period. *J.Clin.Microbiol.* 2000b; 38:2191-2199.

Straubinger RK, Straubinger AF, Summers BA, Jacobson RH. Status of *Borrelia burgdorferi* infection after antibiotic treatment and the effects of corticosteroids: An experimental study. *J.Infect.Dis.* 2000a; 181:1069-1081.

Straubinger RK, Summers BA, Chang YF, Appel MJ. Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. *J.Clin.Microbiol.* 1997; 35:111-116.

Stuen S, Casey AN, Woldehiwet Z, French NP, Ogden NH. Detection by the polymerase chain reaction of *Anaplasma phagocytophilum* in tissues of persistently infected sheep. *J.Comp Pathol.* 2006; 134:101-104.

Tabar MD, Francino O, Altet L, Sanchez A, Ferrer L, Roura X. PCR survey of vectorborne pathogens in dogs living in and around Barcelona, an area endemic for leishmaniasis. *Vet Rec.* 2009; 164:112-116.

Thomas V, Anguita J, Barthold SW, Fikrig E. Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis alters murine immune responses, pathogen burden, and severity of Lyme arthritis. *Infect.Immun.* 2001; 69:3359-3371.

Tokarz R, Kapoor V, Samuel JE, Bouyer DH, Briese T, Lipkin WI. Detection of tick-borne pathogens by MassTag polymerase chain reaction. *Vector.Borne.Zoonotic.Dis.* 2009; 9:147-152.

Trotta M, Carli E, Novari G, Furlanello T, Solano-Gallego L. Clinicopathological findings, molecular detection and characterization of *Babesia gibsoni* infection in a sick dog from Italy. *Vet.Parasitol.* 2009; 165:318-322.

Uilenberg G. *Babesia*--a historical overview. *Vet Parasitol.* 2006; 138:3-10.

van Dam AP, Kuiper H, Vos K, Widjojokusumo A, de Jongh BM, Spanjaard L, Ramselaar AC, Kramer MD, Dankert J. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin.Infect.Dis.* 1993; 17:708-717.

van Overbeek L, Gassner F, van der Plas CL, Kastelein P, Nunes-da RU, Takken W. Diversity of *Ixodes ricinus* tick-associated bacterial communities from different forests. *FEMS Microbiol.Ecol.* 2008; 66:72-84.

von Loewenich FD, Baumgarten BU, Schroppel K, Geissdorfer W, Rollinghoff M, Bogdan C. High diversity of ankA sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. *J.Clin.Microbiol.* 2003; 41:5033-5040.

von Loewenich FD, Geissdorfer W, Disque C, Matten J, Schett G, Sakka SG, Bogdan C. Detection of "Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*" in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant. *J.Clin.Microbiol.* 2010; 48:2630-2635.

Welc-Faleciak R, Rodo A, Sinski E, Bajer A. *Babesia canis* and other tick-borne infections in dogs in Central Poland. *Vet Parasitol.* 2009; 166:191-198.

Wilhelmsson P, Fryland L, Borjesson S, Nordgren J, Bergstrom S, Ernerudh J, Forsberg P, Lindgren PE. Prevalence and diversity of *Borrelia* species in ticks that have bitten humans in Sweden. *J.Clin.Microbiol.* 2010; 48:4169-4176.

Wilske B, Preac-Mursic V, Gobel UB, Graf B, Jauris S, Soutschek E, Schwab E, Zumstein G. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J.Clin.Microbiol.* 1993; 31:340-350.

Wirtgen M, Nahayo A, Linden A, Losson B, Garigliany M, Desmecht D. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in *Dermacentor reticulatus* ticks. *Vet.Rec.* 2011; 168:195.

Wodecka B, Leonska A, Skotarczak B. A comparative analysis of molecular markers for the detection and identification of *Borrelia spirochaetes* in *Ixodes ricinus*. *J Med Microbiol.* 2010; 59:309-314.

Wölfel R, Essbauer S, Dobler G. Diagnostics of tick-borne rickettsioses in Germany: A modern concept for a neglected disease. *International Journal of Medical Microbiology* 2008; 298:368-374.

Yang M, Zhang X, Liu G, Yin Y, Chen K, Yun Q, Zhao D, Al-Mssallem IS, Yu J. The complete chloroplast genome sequence of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *PLoS.One.* 2010; 5:e12762.

Zeidner NS, Dolan MC, Massung R, Piesman J, Fish D. Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis suppresses IL-2 and IFN gamma production and promotes an IL-4 response in C3H/HeJ mice. *Parasite Immunol.* 2000; 22:581-588.

Zhou J. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Curr.Opin.Microbiol.* 2003; 6:288-294.

Zhou Z, Nie K, Tang C, Wang Z, Zhou R, Hu S, Zhang Z. Phylogenetic analysis of the genus *Anaplasma* in Southwestern China based on 16S rRNA sequence. *Res.Vet.Sci.* 2010; 89:262-265.

## IX. ANHANG

### Tabelle A 1: Puffer und Lösungen

#### A 1.1 Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese

<b>50X TAE</b>	Tris Base	242,0	g
	Essigsäure	57,1	ml
	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	37,2	g
	Aqua dest. ad	1000,0	ml
<b>1X TAE</b>	50X TAE	20,0	ml
	Aqua dest.	980,0	ml
<b>1 %ige Agarose</b>	Agarose	1,0	g
	1X TAE	100,0	ml
<b>3 %ige Agarose</b>	Agarose	3,0	g
	1X TAE	100,0	ml
<b>GelRed<sup>TM</sup>-Färbebad</b>	GelRed <sup>TM</sup>	50,0	µl
	Aqua dest.	500,0	ml

#### A 1.2 Puffer und Lösungen zur Verdünnung der Primer

<b>EDTA, 0,5 M, pH 8,0</b>	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	14,6	g
	Aqua dest. ad	70,0	ml
	Einstellen des pH-Wertes auf 8,0 mit 10 M NaOH		
	Aqua dest. ad	100,0	ml
<b>EDTA, 100 mM, pH 8,0</b>	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	2,92	g
	Aqua dest. ad	70,0	ml
	Einstellen des pH-Wertes auf 8,0 mit 10 M NaOH		
	Aqua dest. ad	100,0	ml
<b>Tris-Cl, 100 mM, pH 7,4</b>	Tris Base	1,21	g
	Aqua dest. ad	80,0	ml
	Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 mit konzentrierter HCl		
	Aqua dest. ad	100,0	ml
<b>TE (Tris/EDTA)-Puffer</b>	Tris-Cl, pH 7,4	10,0	ml
	EDTA, pH 8,0	1,0	ml
	Aqua dest.	100,0	ml

**A 1.3 Puffer und Lösungen für die Klonierung**

<b>LB-Medium</b>	Tryptone Peptone	10,0	g
	Hefeextrakt	5,0	g
	NaCl	5,0	g
	Aqua dest. ad	1000,0	ml
<b>LB-Amp-Platten</b>	Bacto Agar	6,0	g
	LB-Medium	500,0	ml
	Zugabe von 25 mg Ampicillin nach Autoklavieren (nach Abkühlen des Mediums auf 50 °C)		
<b>Ampicillin-Lösung</b>	Ampicillin	100,0	mg
	Aqua dest., steril	1,0	ml
<b>Tetrazyklin-Lösung</b>	Tetrazyklin	5,0	mg
	Aqua dest., steril	1,0	ml
<b>LB-Amp-Medium</b>	LB-Medium	5,0	ml
	Ampicillin-Lösung	5,0	µl
<b>X-Gal, 2 %ig</b>	X-Gal	80,0	mg
	DMF	4,0	ml
<b>IPTG, 1 M</b>	IPTG	2,38	g
	Aqua dest.	10,0	ml
<b>IPTG, 25 mM</b>	IPTG, 1 M	250,0	µl
	Aqua dest.	750,0	µl
<b>MgCl<sub>2</sub>, 1 M steril filtriert</b>	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	20,3	g
	Aqua dest. ad	100,0	ml
<b>MgSO<sub>4</sub>, 1 M steril filtriert</b>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	24,6	g
	Aqua dest. ad	100	ml
<b>Glukoselösung, 2 M steril filtriert</b>	Glukose	3,6	g
	Aqua dest.	10,0	ml
<b>SOB-Medium</b>	Tryptone Peptone	20,0	g
	Hefeextrakt, granuliert	5,0	g
	NaCl	0,5	g
	Aqua dest. ad	1000,0	ml
	Nach dem Autoklavieren Zugabe von:		
	MgCl <sub>2</sub> , 1 M	10,0	ml
	MgSO <sub>4</sub> , 1 M	10,0	ml
<b>SOC-Medium</b>	Glukoselösung, 2 M	1,0	ml
	SOB-Medium, autoklaviert, ad	100,0	ml

<b>CaCl<sub>2</sub> stock, 1 M autoklaviert</b>	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	147,0	g
	Aqua dest. ad	1000,0	ml
<b>CaCl<sub>2</sub>, 50 mM</b>	CaCl <sub>2</sub> stock	5,0	ml
	Aqua dest. ad	95,0	ml
<b>Tris-HCl, 1 M, pH 7,5, autoklaviert</b>	Tris-HCl	15,76	g
	Aqua dest. ad	100,0	ml
<b>Tris-HCl, 10 mM</b>	Tris-HCl, 1 M	1,0	ml
	Aqua dest.	99,0	ml
<b>Glycerin, 15 %</b>	Glycerin	3,0	ml
	Aqua dest.	17,0	ml
<b>CaCl<sub>2</sub>-Lösung</b>	Tris-HCl, 10 mM	1,0	ml
	CaCl <sub>2</sub> , 50 mM	5,0	ml
	Glycerin, 15 %	15,0	ml
	Aqua dest.	79,0	ml
<b>Kaliumacetatlösung, 5 M</b>	Kaliumacetat	49,1	g
	Aqua dest. ad	100,0	ml
<b>Alkalische Lyse Lösung I</b>	Tris-HCl, 1 M	2,5	ml
	EDTA, 0,5 M	2,0	ml
	Glukose	0,9	g
	Aqua dest.	95,5	ml
<b>Lösung II</b>	SDS	1,0	g
	NaOH, 1 M	20,0	ml
	Aqua dest.	80,0	ml
<b>Lösung III</b>	Kaliumacetat	60,0	ml
	Essigsäure	11,5	ml
	Aqua dest.	28,5	ml

**Tabelle A 2: Reagenzien und Chemikalien**

Name	Hersteller	Bestellnummer
Agar (BD Bacto Agar™)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland	214030
Agarose, Molecular Biology Grade	Eurogentec GmbH, Köln, Deutschland	EP-0010-05
Ampicillin trihydrate	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland	A6140
β-Mercaptoethanol	Invitrogen Life Technologies™, Carlsbad, USA	31350-010
CaCl <sub>2</sub>	Merck Chemicals,	1023791000



	Darmstadt, Deutschland	
6x DNA Loading Dye	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland	R0611
50 bp DNA Ladder	New England BioLabs <sup>®</sup> GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	N3236
100 bp DNA Ladder	New England BioLabs <sup>®</sup> GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	N3231
1 kb DNA Ladder	New England BioLabs <sup>®</sup> GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	N3232
DMF	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland	1109831000
DMSO	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland	D2650
DNA away <sup>™</sup> (Alkalihydroxidlösung)	Molecular Bio-Products Inc., San Diego, USA	X996.1
dTTP	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland	R0171
Essigsäure, Rotipuran <sup>®</sup> 100 %, p.a.	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3738
Ethanol, Rotipuran <sup>®</sup> 99,8 %, p.a.	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	9065.3
Gel Loading Dye, Blue (6x)	New England BioLabs <sup>®</sup> GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	B7021
GeneAmp <sup>®</sup> 100 mM dNTP Mix with dTTP	Life Technologies <sup>™</sup> GmbH, Applied Biosystems <sup>®</sup> , Darmstadt, Deutschland	N8080261
GelRed <sup>™</sup> Nucleic Acid Gel Stain, 10,000x in water	Biotium, Inc., Hayward, USA	41003
Glukose	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland	G 5146
Glycerin	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3783.1
HCl	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	0281.1
Hefeextrakt, granuliert	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland	103753
IPTG	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland	37-2020
Isopropanol (= 2-Propanol)	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH + Co.	6752.1

	KG, Karlsruhe, Deutschland	
Kaliumacetat	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland	1048201000
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland	R0971
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, ≥ 99 %, p.a., ACS	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	2189.1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, ≥ 99 %, p.a., ACS	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	P027.2
NaCl	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland	1064005000
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O, ≥ 99 %, p.a., ACS	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	8043.2
NaOH	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	T198.1
ROX (reference dye)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland	R4526
RNAse A	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland	EN0531
SDS	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	20765
10x <i>Taq</i> Buffer with KCl	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland	B38
10x <i>Taq</i> Buffer with KCl & 15 mM MgCl <sub>2</sub>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland	B16
Tetrazyklin	Merck4Biosciences, Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland	58346
Tris Base, ≥ 99 %, Ph.Eur., USP	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	A411.3
Tris-HCl	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	9090.2
Tryptone	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland	211705
Wasser, Molecular Biology Reagent	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland	W4502
X-Gal	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland	37-2610

**Tabelle A 3: Enzyme**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
AmpliTaq Gold <sup>®</sup> DNA Polymerase with Gold Buffer and MgCl <sub>2</sub> solution	Life Technologies <sup>™</sup> GmbH, Applied Biosystems <sup>®</sup> , Darmstadt, Deutschland	4311816
EcoRV	New England BioLabs <sup>®</sup> GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	R0195 S
Hinc II	New England BioLabs <sup>®</sup> GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	R0103
peqGOLD Pwo-DNA-Polymerase	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland	01-5010
Sca I	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland	ER0431
Sma I	New England BioLabs <sup>®</sup> GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	R0141
T4 DNA Ligase	New England BioLabs <sup>®</sup> GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	M0202
<i>Taq</i> DNA Polymerase with Standard <i>Taq</i> Buffer	New England BioLabs <sup>®</sup> GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	M0273
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland	EP0282

**Tabelle A 4: Kommerzielle Testsysteme**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
4Dx SNAP <sup>®</sup> Tests	IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA	
DNeasy <sup>®</sup> Blood & Tissue Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland	69506
peqGold Gel Extraction Kit (C-Line)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland	12-2501-02
peqGold Plasmid Miniprep Kit I (C-Line)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland	12-6942-02
QIAfilter Plasmid Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland	12245

**Tabelle A 5: Weitere Materialien**

Name	Hersteller	Bestellnummer
pBluescript® II Phagemid Vector (SK -)	Stratagene, Agilent Technologies GmbH & Co. KG, Waldbronn, Deutschland	212206
XL-1Blue MRF' Supercompetent Cells	Stratagene, Agilent Technologies GmbH & Co. KG, Waldbronn, Deutschland	200230

**Tabelle A 6: Geräte**

Gerät	Hersteller	Typ
Homogenisator	Retsch GmbH & Co. KG., Düsseldorf, Deutschland	MM300
PCR Cycler	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland	Primus advanced 96
PCR Cycler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Mastercycler® pro
Real-time PCR Cycler	Stratagene, Agilent Technologies GmbH & Co. KG, Waldbronn, Deutschland	MxPro Mx3005P und Mx3000P
Spektrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland	NanoDrop ND-1000
Spektrophotometer	Bio-Tek Instruments GmbH, Neufahrn, Deutschland	Uvikon, XS
Transilluminator	UVP Ltd, Cambridge, UK	302 nm
Transilluminator	Biostep GmbH, Chemnitz, Deutschland	UST-30M-8R
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Thermomix comfort
Mikroarray Reader	Alere™ Technologies GmbH, Jena, Deutschland	ArrayMate
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	FA-45-30-11, 5430R

**Tabelle A 7: Verwendete Programme**

<b>Name</b>	<b>Website</b>
<b>Datenbank</b>	
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez</a>
<b>Sequenzanalysen</b>	
BLAST	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Primer3Plus	<a href="http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi">http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi</a>
Praktische Molekularbiologie	<a href="http://molbiol.ru/ger/index.html">http://molbiol.ru/ger/index.html</a>
SMS 2	<a href="http://www.bioinformatics.org/sms2/">http://www.bioinformatics.org/sms2/</a>

**Tabelle A 8: Verwendete Sequenzen (PubMed NCBI GenBank)**

Abkürzungen

IR: *Ixodes ricinus*RS: *Rhipicephalus sanguineus*D(R): *Dermacentor (reticulatus)*

Erreger	NCBI Nr.	beschriebene Herkunft (Wirt, Land)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Referenzsequenz, NC_007797	unbekannt
	AF384212-14	Wiederkäuer, Schweiz
	AF481850-55	Wiederkäuer, Slowenien
	AF482761	Pferd, Deutschland
	AY035312	Schaf, Norwegen
	AY149637	IR, UK
	AY281771-77	IR, Deutschland
	AY281781	IR, Deutschland
	AY281782	IR, Deutschland
	AY281783	IR, Deutschland
	AY281784	IR, Deutschland
	AY281787	IR, Deutschland
	AY281789	IR, Deutschland
	AY281791-93	IR, Deutschland
	AY281795- AY281803	IR, Deutschland
	AY281805	IR, Deutschland
	AY281806-09	IR, Deutschland
	AY527214	Pferd, Deutschland
	AY833407	Mensch, Polen
	DQ029028	Mensch, Italien
	DQ361024-25	Maus, Polen
	EF068224	Hund, Deutschland
	EF068226-28	Hund, Deutschland
	EF217398	Mensch, Tschechien
	EF217400	Maus, Tschechien
	EF217402	Pferd, Tschechien
	EF217404	IR, Tschechien
	EU098006-07	IR, Portugal
	EU436153-54	Rind, Italien
	EU436155	Rind, Italien
	EU490522	IR, Deutschland
	EU781706-07	Hund, Tunesien
	EU839848	Wiederkäuer, Tschechien
	EU839850	Wiederkäuer, Tschechien
	EU839852	Pferd, Tschechien
	EU847526-27	Hund, Tschechien
	EU847529-34	Tschechien
	FJ469667	unbekannt
	FJ515308	Katze, Schweiz
	FJ538289	Ziege, Schweiz
	FJ538290	Ziege, Schweiz
	FJ615530	Mensch, Tschechien
	FJ788511-13	IR, Deutschland
	FJ812388	Rotwild, Österreich
	FJ812389	Rehwild, Österreich

Erreger	NCBI Nr.	beschriebene Herkunft
<i>A. phagocytophilum</i> (Fortsetzung)	FJ812394-401	Wildwiederkäuer, Österreich
	FJ812403-08	Rehwild, Österreich
	GU111741-42	Rotwild, Spanien
	GU111744-47	IR, Spanien
	GU236534-35	Rehwild, Slowenien
	GU236536	Rehwild, Slowenien
	GU236540-68	Rehwild, Deutschland
	GU236571	Rehwild, Spanien
	GU236579	Rotwild, Polen
	GU236582-83	Wiederkäuer, Spanien
	GU236586-600	Wiederkäuer, Polen
	GU236601-40	Schaf, Norwegen
	GU236641-43	Schaf, Deutschland
	GU236644	Schaf, Deutschland
	GU236646	Schaf, Deutschland
	GU236649-50	Schaf, Deutschland
	GU236653-58	Mensch, Slowenien
	GU236664	Mensch, USA
	GU236665-GU236707	Hund, Deutschland/Slowenien
	GU236708-GU236716	Pferd, Deutschland/Schweiz
	GU236717	Katze, Österreich
	GU391312	IR, Polen
	GU391313-18	Schwein, Polen
	GU391319	IR, Polen
	GU391320	Schwein, Polen
	GU391595-96	Hund, Frankreich
	HM138366	Katze, Tschechien
HM480380-83	Rehwild, Deutschland	
HM480384-85	Rehwild, Deutschland	
<i>Anaplasma platys</i>	AF303467	unbekannt, Frankreich
	AY040850-53	unbekannt, UK
	AY530806	Hund, Spanien
	AY821826	Hund, Spanien
	EU004823	unbekannt, Portugal
	EU090182	Ziege, Zypern
	EU439943	Hund, Italien
	GQ395384-85	Hund, Kap Verde
<i>Ehrlichia canis</i>	NC_007354	unbekannt
	AY394465	Hund, Spanien
	AY621071	Hund, Türkei
	EF011110-11	Hund, Griechenland
	EF051166	Hund, Portugal
	EF417993	Hund, Tschechien
	EU439944	Hund, Italien
	EU491504	Hund, Portugal
	EU781686-95	Hund, Tunesien
	GQ857078	RS, Italien
<i>Anaplasma marginale</i>	NC_012026	unbekannt
	NC_004842	unbekannt
	DQ000613-17	Rind, Italien
<i>Anaplasma ovis</i>	EU191230-32	Zecke, Türkei
	GQ857075-76	Zecke, Italien
<i>Anaplasma centrale</i>	NC_013532	unbekannt
	EF520686-90	Rind, Italien
<i>Anaplasma</i> sp.	EU857675	Wiederkäuer, Frankreich
	AY851660	Zecke, Spanien
	AY851662	Zecke, Spanien
	AY851664	Zecke, Spanien

<b>Erreger</b>	<b>NCBI Nr.</b>	<b>beschriebene Herkunft</b>
<b><i>Anaplasma sp. (Fortsetzung)</i></b>	AY851665-67	Wildwiederkäuer, Spanien
	FJ829748-94	Hund, Deutschland
	FN390874-78	Igel, Deutschland
	FN390884-90	Zecke, Deutschland
	GQ179652	Mensch, Slowakei
	GU223365	Rind, Türkei
<b><i>Ehrlichia sp.</i></b>	AF012528	Zecke, Frankreich
	AF057707	Pferd, Schweiz
	AF084907	Zecke, Schweiz
	AF507941	Hund, Österreich
	AJ242785	Zecke, Schweden
	AJ312939-42	Zecke, Deutschland
	DQ647318	IR, Frankreich
	EU191227	Zecke, Türkei
	U10873	Hund, Schweden
	U77389	Pferd, Schweiz
<b><i>Ehrlichia chaffeensis</i></b>	EF417994	Mensch, Tschechien
<b><i>Ehrlichia ovina</i></b>	AF318946	Zecke, Türkei
<b><i>Neoehrlichia mikurensis</i></b>	EU810405	Zecke, Deutschland
<b><i>Babesia canis</i></b>	AJ009795	Hund, Frankreich
	AY072926	Hund, Kroatien
	AY259123-4	Hund, Slowenien
	AY321119	Hund, Polen
	AY703070-73	Hund, Niederlande
	AY611729-33	Hund, Ungarn
	AY648872	Hund, Schweiz
	AY648874	Hund, Schweiz
	AY780888	Zecke, Slowakei
	AY942185	DR, Ungarn
	DQ174288	Hund, Ungarn
	DQ181652-56	Zecke, Ungarn
	EU152128	Zecke, Polen
	EU165369	Hund, Slowakei
	EU622792-3	Hund, Polen
	EU711059-61	Hund, Italien
	FJ913768	Hund, Kroatien
FJ209024	Hund, Kroatien	
GQ325620	Zecke, Polen	
GQ338073	Hund, Norwegen	
<b><i>Babesia vogeli</i></b>	AM183215-16	Hund, Türkei
	AY072925	Hund, Italien
	AY150061	Hund, Spanien
	DQ439545	Hund, Spanien
	EU711062-65	Hund, Italien
	FJ200218	Hund, Kroatien
FJ213774	Hund, Frankreich	
<b><i>Babesia gibsoni</i></b>	AY278443	Hund, Spanien
	FJ209023	Hund, Kroatien
	FJ554534	Hund, Italien
<b><i>Babesia microti</i></b>	AF373332	IR, Slowenien
	AF494286	IR, Schweiz
	AY144692	IR, Schweiz
	AY144700	Hund, Spanien
	AY789075	Zecke, Polen
	EF413181	Mensch, Deutschland
	FJ608739	Pferd, Italien
	GQ856653	IR, Belgien
GU826703-15	IR, Luxemburg	



<b>Erreger</b>	<b>NCBI Nr.</b>	<b>beschriebene Herkunft</b>
<i>Babesia. sp. EU1</i>	AY553915	IR, Slowenien
	AY648877-81	IR, Schweiz
	DQ312434-38	IR, Schweiz
	HQ830266	Rehwild, Frankreich
<i>Babesia divergens</i>	AJ439713	Mensch, Portugal
	AY572456	Rehwild, Slowenien
	AY648871	Wiederkäuer, Österreich
	AY648873	Wiederkäuer, Schweiz
	AY648875-76	IR, Schweiz
	AY789076	Zecke, Polen
	DQ083544	Rehwild, Polen
	DQ866843-44	Rehwild, Spanien
	EF458219	Wiederkäuer, Deutschland
	EF458220-27	Wiederkäuer, Irland
	EF458228	Mensch, Frankreich
	EU182594-95	Wiederkäuer, Schweiz
	FJ944822	Mensch, Frankreich
	FJ944823	Mensch, Frankreich
	FJ944824-26	Wiederkäuer, Frankreich
	HQ395757	unbekannt, Ungarn
<i>Babesia bigemina</i>	AY648884	Wiederkäuer, Österreich
	DQ316966	Rind, Schweiz
	DQ785311	Rind, Spanien
	EU622822	Rind, Türkei
	HQ197737-41	Wiederkäuer, Türkei
<i>Babesia major</i>	AY648886	Wiederkäuer, Österreich
	DQ312442	IR, Schweiz
	EU622825	Rind, Türkei
	EU622907	Wiederkäuer, Frankreich
	GU194290	Rind, Frankreich
<i>Babesia capreoli</i>	AY726010	Rehwild, Europa
	FJ944827-28	Rehwild, Frankreich
<i>Babesia motasi</i>	AY260179-80	Schaf, Niederlande
	AY533147	Schaf, Spanien
<i>Babesia caballi</i>	AY309955	Pferd, Spanien
	AY534883	Pferd, Spanien
	FJ209026	Hund, Kroatien
<i>Babesia odocoilei</i>	AY046577	unbekannt, Europa
<i>Babesia equi</i>	AY150062-63	Pferd, Spanien
	AY150064	Hund, Spanien
	AY648885	Pferd, Schweiz
	DQ287951	Pferd, Spanien
	FJ608734	Pferd, Italien
<i>Babesia bovis</i>	AY150059	Kuh, Portugal
<i>Babesia ovis</i>	AY150058	Ziege, Spanien
	AY260178	Schaf, Türkei
	AY533146	Schaf, Spanien
	AY998123-24	Wiederkäuer, Türkei
	DQ287954	Ziege, Spanien
<i>Babesia veruspiginis</i>	AJ871610	Fledermaus, UK
<i>Babesia bennetti</i>	DQ402155	Möwe, Spanien
<i>Babesia cf. crassa</i>	AY260177	Schaf, Türkei
<i>Babesia sp.</i>	AF188001	Hund, Spanien
	AY457974-76	Hund, Spanien
	AY572457	Rehwild, Slowenien
	DQ312432-33	IR, Schweiz
	DQ520838	Rehwild, Polen
	EF545557-62	Wiederkäuer, Schweiz

Erreger	NCBI Nr.	beschriebene Herkunft	
<b><i>Babesia</i> sp. (Fortsetzung)</b>	EU622824	Rind, Türkei	
	FJ608737	Pferd, Italien	
	GU475474	Rotwild, Irland	
	GU647159	IR, Italien	
	GU734328	IR, Frankreich	
	GU826716-37	IR, Luxemburg	
	GQ856650-57	IR, Belgien	
<b><i>Babesia microti</i>-like (= <i>Theileria annae</i>)</b>	AY534602	Hund, Spanien	
	FJ209022	Hund, Kroatien	
	HM212628	Fuchs, Kroatien	
<b><i>Theileria equi</i></b>	AY534882	Pferd, Spanien	
	FJ209021	Hund, Kroatien	
<b><i>Theileria capreoli</i></b>	AY726008	Rehwild, Europa	
	AY726011	Rehwild, Spanien	
<b><i>Theileria annulata</i></b>	AY150056	Kuh, Frankreich	
	DQ287944	Hund, Spanien	
	EU622823	Rind, Türkei	
	GQ465761	Rind, Portugal	
<b><i>Theileria ovis</i></b>	HQ197730-33	Wiederkäuer, Türkei	
	AY533144	Schaf, Spanien	
	EF092453	Ziege, Türkei	
	EU187501	Zecke, Kroatien	
	FJ608727-33	Schaf, Italien	
<b><i>Theileria sergenti</i></b>	HM241894	Schaf, Türkei	
	FJ225392	Kuh, Spanien	
<b><i>Theileria orientalis</i></b>	HQ197734-36	Wiederkäuer, Türkei	
<b><i>Theileria buffeli</i></b>	DQ287959	Kuh, Spanien	
	FJ426360	Rind, Italien	
	AY616716-18	Wiederkäuer, Portugal	
<b><i>Theileria</i> sp.</b>	DQ009882	Rehwild, Polen	
	DQ866840	Rotwild, Spanien	
	DQ866841-42	Rehwild, Spanien	
	GU373976	Wildwiederkäuer, Italien	
	GU373981	Schwein, Italien	
	GU373984	Rehwild, Italien	
	HM212629	Fuchs, Kroatien	
	AY461378	Hund, Spanien	
	AY731062	Fuchs, Spanien	
	DQ060324	Hund, Türkei	
<b><i>Hepatozoon canis</i></b>	DQ060326-27	Hund, Türkei	
	DQ060329	Hund, Türkei	
	DQ439541	Fuchs, Spanien	
	DQ439542	Hund, Spanien	
	EU165370	Fuchs, Polen	
	EU622909	Katze, Frankreich	
	FJ497009-22	Hund, Kroatien	
	FJ608736	Hund, Italien	
	GU371446	Fuchs, Italien	
	GU371450-58	Fuchs, Italien	
	GU827130	IR, Luxemburg	
	<b><i>Hepatozoon felis</i></b>	AY620232	Katze, Spanien
		AY628681	Katze, Spanien
<b><i>Hepatozoon</i> sp.</b>	AY600625-26	Maus, Spanien	
	FJ497023-24	Hund, Kroatien	
	HM212627	Fuchs, Kroatien	
<b><i>Borrelia afzelii</i></b>	Referenzsequenz, NC_008564	unbekannt	

Erreger	NCBI Nr.	beschriebene Herkunft
<b><i>Borrelia afzelii</i> (Fortsetzung)</b>	Referenzsequenz, NC_011786	unbekannt
	AB253532	unbekannt
	AY518771	unbekannt
	DQ007298-303	Mensch, Ungarn
	DQ155611	Nager, Deutschland
	DQ155614	Nager, Deutschland
	DQ155618	Nager, Deutschland
	DQ155623-25	Nager, Deutschland
	DQ155634	Nager, Deutschland
	DQ155637	Nager, Deutschland
	DQ155641	Nager, Deutschland
	DQ155643	Nager, Deutschland
	DQ193521-22	IR, Ungarn
	FJ750337-39	unbekannt
	GU826902	IR, Luxemburg
	GU826917	IR, Luxemburg
	GU826935	IR, Luxemburg
	GU826937-38	IR, Luxemburg
	GU826940	IR, Luxemburg
	U20356	unbekannt
X85437-39	unbekannt	
X85982	unbekannt	
X95353	unbekannt	
<b><i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i></b>	NC_001857	unbekannt
	NC_011876	unbekannt
	NC_012175	unbekannt
	NC_012193	unbekannt
	NC_012194	unbekannt
	NC_012199	unbekannt
	NC_012241	unbekannt
	NC_012244	unbekannt
	NC_012504	unbekannt
	AF481789	Mensch, Schweden
	DQ111051-52	unbekannt
	DQ393312	unbekannt
	M57248	unbekannt
	U65806	unbekannt
	U65807	unbekannt
	X16467	Zecke, unbekannt
	X85442	unbekannt
	X85443	unbekannt
<b><i>Borrelia garinii</i></b>	Referenzsequenz, NC_006129	unbekannt
	AF227319-22	unbekannt, Spanien
	AF481790-91	Mensch, Schweden
	AM184123	unbekannt
	AY597035-36	unbekannt, Slowakei
	EF364112	unbekannt, Tschechien
	EF364116	unbekannt, Tschechien
	DQ111053	unbekannt
	DQ155629	Nager, Deutschland
	DQ155633	Nager, Deutschland
	DQ193523	IR, Ungarn
	GU724958	unbekannt
	GU826952-63	IR, Luxemburg
GU826965-66	IR, Luxemburg	
GU826968	IR, Luxemburg	

<b>Erreger</b>	<b>NCBI Nr.</b>	<b>beschriebene Herkunft</b>
<b><i>Borrelia garinii</i> (Fortsetzung)</b>	GU826970	IR, Luxemburg
	GU826982	IR, Luxemburg
	GU826986	IR, Luxemburg
	GU826995-98	IR, Luxemburg
	GU906888	IR, Slowakei
	U20358	unbekannt
	X80252	unbekannt
	X80254	unbekannt
	X80256-57	unbekannt
	X85440	unbekannt
	X85441	unbekannt
	X95354-60	Mensch, Deutschland
	X95362	Mensch, Deutschland
	Y10894-96	unbekannt
<b><i>Borrelia spielmanii</i></b>	Referenzsequenz, NC_012164	unbekannt
	AF102057	unbekannt
	AM055822-23	unbekannt, Dänemark
	AM055824	unbekannt, Ungarn
	AY147007	IR, Frankreich
	AY995900	unbekannt, Ungarn
	DQ133517-19	IR, Frankreich
	EU545183	IR, Türkei
	GU827001	IR, Luxemburg
	<b><i>Borrelia burgdorferi</i></b>	A24006
A24008		unbekannt
A04009		unbekannt
A22442		unbekannt
A33374		unbekannt
DQ007297		Mensch, Ungarn
DQ147805		unbekannt
DQ155620		Nager, Deutschland
DQ155628		Nager, Deutschland
DQ155640		Nager, Deutschland
DQ193524-25		IR, Ungarn
DQ393314-17		unbekannt
EF364115		unbekannt, Tschechien
GU320003		unbekannt, Slowakei
GU724959		unbekannt
GU724961		unbekannt
GU826941-51		IR, Luxemburg
L38657		unbekannt, Dänemark
M88764		unbekannt
S72439		unbekannt
S48322-23		unbekannt
U65801		unbekannt
X68539-44		unbekannt
X80182-86		unbekannt
X80253		unbekannt
X80251		unbekannt
X85739		unbekannt
X60300		Zecke, unbekannt
X62161		unbekannt
X62387		unbekannt
X63412		unbekannt
X65599		unbekannt
X66065	unbekannt	
X69323	unbekannt	

Erreger	NCBI Nr.	beschriebene Herkunft
<i>Borrelia burgdorferi</i> (Fortsetzung)	X81047	Mensch, unbekannt
	X83622	unbekannt
	X95361	unbekannt
	Y10837-41	unbekannt
	Z29086-87	unbekannt
<i>Borrelia</i> sp.	NC_012234	unbekannt
	AM158262-65	Wirbeltier, Deutschland
	AM158266-67	Wirbeltier, Slowenien
	GU826999	IR, Luxemburg
	HM623293-94	IR, Norwegen
	U20359	unbekannt
<i>Borrelia valaisiana</i>	AF095940-47	unbekannt
	AJ249467	unbekannt
	DQ393331-32	unbekannt
	GU827002-28	IR, Luxemburg
<i>Borrelia lusitaniae</i>	EF179549-67	unbekannt
	EF457554-58	unbekannt, Italien
	Y10837-39	unbekannt
<i>Borrelia bissetii</i>	Y10897	unbekannt
<i>Borrelia japonica</i>	Y10890-93	unbekannt
<i>Rickettsia helvetica ompB</i>	AF123725	unbekannt
	EU126928	IR, Portugal
	GU324464	Maus, Deutschland
	GU324465	Waldmaus, Deutschland
<i>Rickettsia conorii ompB</i>	AF123721	unbekannt
	AF149110	unbekannt
	AY643093	unbekannt
<i>Rickettsia sibirica ompB</i>	AF123722	unbekannt
<i>R. sibirica</i> subsp. <i>mongolotimonae</i> <i>ompB</i>	AF123715	unbekannt, Frankreich
<i>Rickettsia slovacica ompB</i>	AF123723	unbekannt, Slowakei
<i>Rickettsia massiliae ompB</i>	NC_009900	unbekannt
	AF123714	unbekannt, Frankreich
<i>Rickettsia monacensis ompB</i>	EF380356	unbekannt, Deutschland
	EU330639-40	IR, Deutschland
<i>Rickettsia felis ompB</i>	GU324466-70	Maus, Deutschland
<i>Rickettsia rickettsii ompB</i>	X16353	unbekannt
<i>Rickettsia raoultii ompB</i>	DQ365797	Zecke, Frankreich
<i>Rickettsia prowazekii ompB</i>	AF123718	unbekannt, Polen
	AF161079	unbekannt
	AF211820-21	unbekannt
<i>Rickettsia</i> sp. <i>ompB</i>	AF123710	unbekannt, Spanien
<i>Rickettsia helvetica gltA</i>	DQ131912	<i>Ixodes persulcatus</i> , Russland
	EU359283	<i>Ixodes</i> spp., Schweiz
	EU359285-87	<i>Ixodes</i> spp., Schweiz
	U59723	unbekannt
<i>Rickettsia conorii gltA</i>	Referenzsequenz, NC_003103	unbekannt
	EU716648	unbekannt
	HM050292	<i>Rhipicephalus evertsi</i> , Senegal
	U20243	unbekannt
	U59730	unbekannt
<i>R. sibirica</i> subsp. <i>mongolotimonae</i> <i>gltA</i>	DQ423370	unbekannt, Portugal
<i>Rickettsia slovacica gltA</i>	AY129301	<i>D. marginatus</i> , Frankreich
	U59725	unbekannt
<i>Rickettsia massiliae gltA</i>	Referenzsequenz, NC_009900	unbekannt

Erreger	NCBI Nr.	beschriebene Herkunft
<i>Rickettsia massiliae gltA</i> (Fortsetzung)	U59719	unbekannt
<i>Rickettsia monacensis gltA</i>	DQ517498	Mensch, Spanien
	HM210740	IR, Italien
<i>Rickettsia bellii gltA</i>	Referenzsequenz, NC_007940	unbekannt
	Referenzsequenz, NC_009883	<i>D. variabilis</i> , USA
	U59716	unbekannt
<i>Rickettsia canadensis gltA</i>	Referenzsequenz, NC_009879	unbekannt
	U59713	unbekannt
<i>Rickettsia akari gltA</i>	U59717	unbekannt
<i>Rickettsia principis gltA</i>	AY578115	<i>Haemaphysalis</i> sp., unbekannt
<i>Israeli tick typhus Rickettsia gltA</i>	EF077650-54	RS, Portugal
	EF177484	unbekannt, Portugal
	U59727	unbekannt
<i>Rickettsia peacockii gltA</i>	Referenzsequenz, NC_012730	unbekannt
<i>Rickettsia endosymbiont gltA</i>	DQ081187	<i>Haemaphysalis</i> sp., Kroatien
<i>Cand. Rickettsia barbariae gltA</i>	EU272185	Zecke, Italien
<i>Cand. R. hoogstraalii gltA</i>	FJ767737	Haemaphysalis, Kroatien
<i>Rickettsia sp. gltA</i>	AF120029	Zecke, Russland
	AF140706	IR, Slowakei
	AF210692	unbekannt
	AY129300	<i>D. marginatus</i> , Frankreich
	DQ423369	unbekannt, Portugal
	EF501755-56	IR, Portugal
	EU359298	Zecke, Schweiz
	EU853834	<i>Haemaphysalis inermis</i> , Ungarn
	GU124744	Zecke, UK
	GQ404430	<i>D. marginatus</i> , Spanien
	HM149279	Zecke, Portugal
	HM149280	IR, Portugal
	HM149281	<i>D. marginatus</i> , Portugal
	HM149282	RS, Portugal
	HM149283	IR, Portugal
	U59720	unbekannt
	U59722	unbekannt
	U59728	unbekannt
	U59731	unbekannt
	U59735	unbekannt

**Tabelle A 9: Übersicht der ausgewählten Pathogene**<sup>a</sup>vermutet

Spezies	Verbreitung	mögliche Wirtsspezies	beschriebene Vektoren	Referenz
<i>Ap</i>	weltweit	Hund, Katze, Pferd, Nager, Wiederkäuer, Mensch	<i>Ixodes</i> spp.	(RAR et al., 2011; SCHAARSCHMIDT-KIENER et al., 2009)
			<i>D. reticulatus</i> <sup>a</sup>	(WIRTGEN et al., 2011)
<i>Apl</i>	USA, Asien, Südeuropa	Hund	<i>R. sanguineus</i> <sup>a</sup>	(RAR et al., 2011; SHAW et al., 2001)
<i>Ec</i>	weltweit	Hund, Mensch	<i>R. sanguineus</i> , <i>D. variabilis</i>	(DAY, 2011; SHAW et al., 2001)
<i>B. canis</i>	tropisch/subtropische Regionen weltweit	Hund, Katze <sup>a</sup>	<i>Dermacentor</i> spp., <i>R. sanguineus</i>	(DAY, 2011; SHAW et al., 2001; UILENBERG, 2006)
<i>B. vogeli</i>	tropisch/subtropische Regionen weltweit	Hund	<i>R. sanguineus</i>	(SHAW et al., 2001; TABAR et al., 2009; UILENBERG, 2006)
<i>B. gibsoni</i>	weltweit	Hund	<i>R. sanguineus</i> , <i>Haemaphysalis</i> spp.	(SHAW et al., 2001; UILENBERG, 2006)
<i>Ba</i>	Europa, Asien	Mensch, Hund, Nager	<i>Ixodes</i> spp.	(HOVIUS et al., 1999; MARGOS et al., 2011; SHAW et al., 2001; SPECK et al., 2001)
<i>Bg</i>	Europa, Asien	Mensch, Hund, Vögel, Nager	<i>Ixodes</i> spp.	
<i>Bbss</i>	Europa, Nordamerika	Mensch, Hund, Nager	<i>Ixodes</i> spp.	
<i>Rc</i>	Europa, Afrika, Asien	Mensch, Hund	<i>R. sanguineus</i>	(DAY, 2011; LEVIN et al., 2011; PAROLA et al., 2005a; SHAW et al., 2001)
<i>Rh</i>	Europa, Asien	Mensch, Hund, Hirsch	<i>I. ricinus</i>	(BORETTI et al., 2009; DOBLER et al., 2009; INOKUMA et al., 2008; PAROLA et al., 2005a)
			<i>D. reticulatus</i> <sup>a</sup>	(DOBEC et al., 2009)

## Tabelle A 10: Ausschnitte aus den Matchtabellen

Tabelle A 10.1: Ausschnitt Matchtabelle (*Anaplasma* spp./*Ehrlichia* spp.)

Sonde	Referenzsequenz <i>A. phagocytophilum</i> , NC_007797	<i>A. phagocytophilum</i> , Zecke, Deutschland, AY281805	<i>A. phagocytophilum</i> , Katze, Schweiz, F1515308	<i>A. phagocytophilum</i> , Zecke, Deutschland, AY281794	<i>A. platys</i> , Portugal, EU004823	<i>A. platys</i> , Portugal, EU004823	<i>A. platys</i> , Hund, Italien, EU439943	<i>A. platys</i> , Frankreich, AF303467	<i>A. platys</i> , Ziege, Zypern, EU090182	Referenzsequenz <i>E. canis</i> , NC_007354	<i>E. canis</i> , Zecke, Italien, GQ857078	<i>E. canis</i> , Hund, Spanien, AY394465	<i>E. canis</i> , Hund, Türkei, AY621071	<i>E. canis</i> , Hund, Griechenland, EF01111
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	2						4	4	4	4	4
6	6	6	6	6	0	0	0	0	3					
7	1	1	1	3						5	5	5	5	5
8	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5	5
Mismatches	5	5	5	4	5	5	5	5	4	3	3	3	3	3



Tabelle A 10.2: Ausschnitt Matchtabelle (*Babesia* spp.)

Sonde	<i>B. canis</i> , Zecke, Ungarn, AY942185	<i>B. canis</i> , Hund, Kroatien, AY072926	<i>B. canis</i> , Zecke, Ungarn, DQ181656	<i>B. vogeli</i> , Hund, Spanien, AY150061	<i>B. vogeli</i> , Hund, Türkei, AM1832116	<i>B. vogeli</i> , Hund, Türkei, AM183215	<i>B. vogeli</i> , Hund, Kroatien, FJ200218	<i>B. vogeli</i> , Hund, Italien, AY072925	<i>B. gibsoni</i> , Hund, Spanien, AY278443	<i>B. gibsoni</i> , Hund, Kroatien, FJ209023	<i>B. gibsoni</i> , Hund, Italien, FJ554534
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	1	0	0	1	1	5	5	5
13	1	1	1	0	1	1	0	0	6	6	6
14	5	5	5	6	5	5	6	6	0	0	0
15	0	0	0	1	0	0	1	1	5	5	5
16	0	0	2								
17				0	1	1	0	0			
18									0	0	0
19	0	0	2								
20	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Mismatches	8	8	6	4	6	6	4	4	9	9	9

Tabelle A 10.3: Ausschnitt Matchtabelle (*Borrelia* spp.)

Sonde	<i>B. afzelii</i> , Mensch, Ungarn, DQ007300	<i>B. afzelii</i> , X85438	<i>B. afzelii</i> , U20356	Referenzsequenz <i>B. afzelii</i> , NC_008564	<i>B. afzelii</i> , Nager, Deutschland, DQ155611	<i>B. garinii</i> , Mensch, Deutschland, X95362	Referenzsequenz <i>B. garinii</i> , NC_006129	<i>B. garinii</i> , Spanien, AF227320	<i>B. garinii</i> , Spanien, AF227321	Referenzsequenz <i>Bbs</i> B31, NC_001857	<i>Bbs</i> , U65807	Referenzsequenz <i>Bbs</i> , NC_011876	<i>B. lusitanae</i> , EF457554
29	2	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0	4
30	5	5	5	5	5	5	4	5	5	0	0	0	3
31	2	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0	4
32	5	5	5	5	5		5	6	7	0		0	
33	6	6	8	7	7	5	0	4	4	6	6	6	5
34	3	3	3	3	3	0	3	0	0	6	6	6	6
35	4	4	4	4	4	3	0	3	3	5	5	5	5
36	6	6	6	6	6		5			0	0	0	5
37	5	5	5	5	5		5			0	0	0	4
38	5	5	5	5	5	5	4	5	5	0	0	0	4
39	0	0	0	0	0	3	4	3	3	5	5	5	6
40	0	0	0	0	0		3			5		5	
41	1	1	0	0	0	3		5	6	6	6	6	
42	1	1	1	0	0	4		6	6				
43	1	1	1	1	1	2	1	2	2	1	1	1	1
44	7	7	8	7	7								6
45	7	7	8	7	7					5	5	5	6
Mismatches	4	4	6	7	7	2	3	4	4	7	6	7	

**Tabelle A 10.4: Ausschnitt Matchtabelle (*Rickettsia* spp. *gltA*)**

Sonde	<i>R. helvetica</i> , Zecke, Schweiz, EU359287	<i>R. helvetica</i> , U59723	<i>R. helvetica</i> , Zecke, Schweiz, EU359283	Referenzsequenz <i>R. conorii</i> , NC_003103	<i>R. conorii</i> , U59730	<i>R. conorii</i> , EU716648	<i>R. conorii</i> , U20243	<i>R. massillae</i> , NC_009900	<i>R. mongolotimonae</i> , Portugal, DQ423370	<i>R. slovaca</i> , Zecke, Frankreich, AY129301	<i>R. monacensis</i> , Mensch, Spanien, DQ517498
25	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	3
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
28	1	1	1	1	1	1	0	2	1	1	3
Mismatches	4	4	4	0	0	0	4	5	4	4	1

Tabelle A 10.5: Ausschnitt Matchtabelle (*Rickettsia* spp. ompB)

Sonde	<i>R. helvetica</i> , AF123725	<i>R. helvetica</i> , Maus, Deutschland, GU324464	<i>R. conorii</i> , AY643093	<i>R. conorii</i> , AF123721	<i>R. conorii</i> , AF149110	<i>R. slovaca</i> , Slowakei, AF123723	<i>R. raoultii</i> , Zecke, Frankreich, DQ365797	<i>R. mongolotimonae</i> , Frankreich, AF123715	<i>R. sibirica</i> , AF123722	Referenzsequenz <i>R. massillae</i> , NC_009900	<i>R. monacensis</i> , Deutschland, EF380356	<i>R. felis</i> , Maus, Deutschland, GU324466
21	0	0										
22	0	0										
23			1	0	0	2	2	1	1	4	4	3
24	5	5	0	0	0	1	2	0	0	2	3	2
Mismatches	2	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1	1

### Abbildung A 1: Layout DNA-Mikroarray

Sonden 1-9: *Anaplasma/Ehrlichia* spp. (genus- und speziesspezifische Sonden)

Sonden 10-20: *Babesia* spp. (genus- und speziesspezifische Sonden)

Sonden 21-24: *Rickettsia* spp. *ompB* (speziesspezifische Sonden)

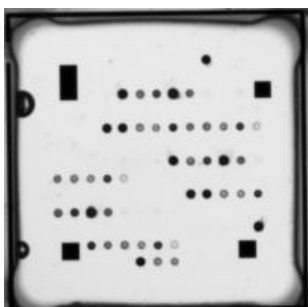
Sonden 25-28: *Rickettsia* spp. *gltA* (genusspezifische Sonden)

Sonden 29-45: *Borrelia* spp. (speziesspezifische Sonden)

46: Leerwert (Negativkontrolle)

47: Biotinmarker (Positivkontrolle)

					43	44	45	46	47			
		33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	
		23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
44	45	46	47	1	2	3	4	5	6	7	8	9
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
39	40	41	42	43	44	45	46	47	1	2	3	4
26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
		4	5	6	7	8	9	10	11	12		
					1	2	3					



**Abbildung A 2: Charakterisierung der unspezifischen Bande von *D. reticulatus***

Sonde 1: *Anaplasma/Ehrlichia* consensus (Genusnachweis)

Sonde 4: *E. canis* (Speziesnachweis)

Sonde 8: *E. canis* (Speziesnachweis)

Ausschnitt aus der unspezifischen Sequenz von *D. reticulatus*

Ausschnitt aus der 16S rRNA der *E. canis*-Referenzsequenz (NC\_007354)

<p><b>Sonde 1</b>  <b>unsp. Sequenz <i>Dermacentor</i></b>  <b>Referenzsequenz <i>E. canis</i></b></p>	<pre> ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC AGACACGGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA AGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA                     </pre>
<p><b>Sonde 4</b>  <b>unsp. Sequenz <i>Dermacentor</i></b>  <b>Referenzsequenz <i>E. canis</i></b></p>	<pre> ATTAGCTAGTTGGTGAAGGTAATGGCTTACCAA TCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCG TTAGATTAGCTAGTTGGTGAAGGTAATGGCTTACCAAGGCT                     </pre>
<p><b>Sonde 8</b>  <b>unsp. Sequenz <i>Dermacentor</i></b>  <b>Referenzsequenz <i>E. canis</i></b></p>	<pre> ACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAAGGTAATGGC GCCC GCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTAC GCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAAGGTAATGGCTTAC                     </pre>

**Abbildung A 3: Charakterisierung der unspezifischen Bande von *I. ricinus***

Sonde 1: *Anaplasma/Ehrlichia* consensus (Genusnachweis)

Sonde 4: *E. canis* (Speziesnachweis)

Sonde 8: *E. canis* (Speziesnachweis)

Ausschnitt aus der unspezifischen Sequenz von *I. ricinus*

Ausschnitt aus der 16S rRNA der *E. canis*-Referenzsequenz (NC\_007354)

<b>Sonde 1</b>	
<b>unsp. Sequenz <i>Ixodes</i></b>	ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC
<b>Referenzsequenz <i>E. canis</i></b>	AGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA AGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
<b>Sonde 4</b>	
<b>unsp. Sequenz <i>Ixodes</i></b>	ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAA'
<b>Referenzsequenz <i>E. canis</i></b>	CAGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGC' TTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGC'
<b>Sonde 8</b>	
<b>unsp. Sequenz <i>Ixodes</i></b>	ACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGC'
<b>Referenzsequenz <i>E. canis</i></b>	GCCCATGCAGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCAC GCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTTAC





## X. DANKSAGUNGEN

Mein Dank gilt insbesondere Herrn Prof. Dr. Reinhard Straubinger für die Überlassung des interessanten Themas und die Betreuung der Doktorarbeit. Das Vertrauen, das er in all seine Doktoranden hat, eigene Ideen und Herangehensweisen zu entwickeln und umzusetzen, zusammen mit den vielen hilfreichen Ratschlägen, hat mich immer wieder sehr motiviert.

Folgenden Personen möchte ich für die Bereitstellung von Probenmaterial danken:

Herrn Prof. Hans Lutz und Frau Dr. Marina Meli, Herrn Prof. Edward Breitschwerdt und Herrn Prof. Adam Birkenheuer, Frau Dr. Dania Richter, Herrn Dr. Nikola Pantchev, Herrn Dr. Erich Zweygarth, Herrn Dr. Gerhard Dobler und Frau Dr. Stephanie Speck, Herrn Dr. Volker Fingerle und Herrn Dr. Torsten Naucke.

Herrn Dr. Ralf Ehricht und Frau Dr. Elke Müller danke ich für die Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Entwicklung und Validierung des Mikroarrays.

Mein Dank gilt allen Tierärzten, Klinikmitarbeitern und Patientenbesitzern, die ihre Hunde im Rahmen der Vorstudie zur Verfügung gestellt und Blutproben gesammelt haben.

Herrn Leif Lorentzen danke ich für die Überlassung des Themas der Vorstudie und die Bereitstellung der SNAP-Tests. Frau Dr. Sauter-Louis danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten der Vorstudie.

Alexander Freiesleben und Marcel Siemer danke ich für das Fotografieren der Mikroarrays und des Readers und die Bereitstellung der Fotos.

Ich danke meiner gesamten Arbeitsgruppe für die schöne Zeit, insbesondere Anna, Inke und Viktor, die mich jederzeit fachlich, aber auch freundschaftlich unterstützt und aufgemuntert haben.

Bei meinen Eltern und meiner Familie bedanke ich mich für das Verständnis, die mentalen Aufbauarbeiten und den Rückhalt, den ich immer bei ihnen habe.

Marcel, ich danke Dir für Deine große Unterstützung, Deine Geduld und dass Du immer an meiner Seite stehst.